



**You have downloaded a document from  
RE-BUŚ  
repository of the University of Silesia in Katowice**

**Title:** Ocena zmian morfologii, składu chemicznego i struktury elektronowej powierzchni bakterii z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego oraz spektroskopu fotoelektronów

**Author:** Justyna Płoszaj-Pyrek

**Citation style:** Płoszaj-Pyrek Justyna. (2016). Ocena zmian morfologii, składu chemicznego i struktury elektronowej powierzchni bakterii z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego oraz spektroskopu fotoelektronów. Praca doktorska. Katowice: Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI  
W KATOWICACH



Biblioteka  
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego

Uniwersytet Śląski w Katowicach  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Instytut Fizyki im. A. Chełkowskiego  
Zakład Fizyki Kryształów

Justyna Płoszaj-Pyrek

PRACA DOKTORSKA

***OCENA ZMIAN MORFOLOGII, SKŁADU CHEMICZNEGO  
I STRUKTURY ELEKTRONOWEJ POWIERZCHNI BAKTERII  
Z WYKORZYSTANIEM SKANINGOWEGO MIKROSKOPU  
ELEKTRONOWEGO ORAZ SPEKTROSKOPU  
FOTOELEKTRONÓW***

Promotor:

Prof. dr hab. Ewa Talik

Kopromotor:

Prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget

Katowice, 2016

*Robertowi i Arkadiuszowi*

**„Duża wiedza czyni skromnym, mała zarozumiałym.**

**Puste kłosa dumnie wznoszą się ku niebu,  
kłosa pełne ziarna w pokorze chylą się ku ziemi”.**

**Caldwell Erskine**

*Składam serdeczne podziękowania:*

- *Pani Prof. Dr hab. Ewie Talik promotorowi niniejszej pracy, za okazaną pomoc i współpracę w trakcie jej realizacji oraz za cenne wskazówki przy przeprowadzaniu badań z użyciem spektroskopu fotoelektronów wzbudzanych promieniami rentgenowskimi (XPS) oraz wykonanie zdjęć z mikroskopu skaningowego Cryo-SEM.*
- *Pani Prof. Dr hab. Zofii Piotrowskiej-Seget za podjęcie się obowiązków kopromotora oraz za nieocenioną, okazywaną zawsze z wielką życzliwością pomoc w wykonywaniu i pisaniu pracy.*
- *Panu Prof. Józefowi S. Pastuszka za udostępnienie materiału badawczego do pracy.*
- *Wszystkim Koleżankom i Kolegom z ZFK za życzliwość i wspierającą atmosferę pracy.*
- *Mojej Rodzinie za wsparcie i zrozumienie.*

*Justyna Płoszaj-Pyrek*

## Spis treści

1. Wprowadzenie .....	7
2. Przegląd literatury .....	8
2.1. Charakterystyka <i>Procaryota</i> .....	8
2.2. Morfologia bakterii .....	9
2.2.1. Formy komórek bakteryjnych .....	10
2.3. Ściana komórkowa .....	11
2.3.1. Warstwa S .....	14
2.3.2. Budowa osłon komórkowych bakterii Gram-dodatnich .....	14
2.3.3. Błona zewnętrzna bakterii Gram-ujemnych .....	17
2.4. Otoczki bakteryjne .....	24
2.5. Powietrze, jako środowisko życia bakterii .....	25
3. Spektroskopia fotoelektronów wzbudzonych promieniowaniem rentgenowskim XPS .....	28
3.1. Podstawy fizyczne techniki XPS .....	30
3.2. Opis procesu fotoemisji .....	35
3.2.1. Widma fotoelektronów XPS .....	37
3.3. Analiza widm XPS .....	38
3.3.1. Przesunięcie chemiczne .....	40
3.3.2. Program <i>Multipak</i> .....	47
3.3.3. Analiza ilościowa .....	48
3.4. Budowa spektrometru XPS .....	50
3.5. Zastosowanie spektroskopii XPS .....	53
3.6. Przebieg pomiarów – Spektrometr fotoelektronów XPS .....	55
4. Podstawy fizyczne techniki SEM .....	57
4.1. Skanujący mikroskop elektronowy SEM .....	59
4.2. Budowa mikroskopu SEM .....	60
4.3. Oddziaływanie wiązki elektronów z materiałem próbki .....	65
4.4. Zastosowanie skaningowej mikroskopii elektronowej .....	70
4.5. Mikroskop JEOL JSM-7600F (FE-SEM) .....	72
4.5.1. Przystawka "Cryo-SEM" .....	76
5. Cel pracy i zakres badań .....	79
5.1. Materiały i metody .....	79
5.2. Pobór próbek powietrza .....	80

5.3. Mikroorganizmy z oczyszczalni ścieków .....	81
5.4. Wpływ temperatury i pH na skład powierzchniowych warstw badanych bakterii .....	82
6. Warunki eksperymentalne .....	84
6.1. Preparatyka próbek do pomiarów XPS i Cryo-SEM .....	84
6.1.1. Sposób przygotowania materiału do pomiarów XPS .....	84
6.1.2. Sposób przygotowania materiału do pomiarów Cryo-SEM.....	85
7. Wyniki .....	88
7.1. Analiza bakterii pobranych w gabinetach stomatologicznych.....	88
7.2. Analiza powierzchniowych struktur bakterii zebranych z oczyszczalni ścieków .....	101
7.3. Wpływ temperatury na skład chemiczny i morfologię <i>B. subtilis</i> i <i>E. coli</i> .....	120
7.4. Wpływ pH podłoża hodowlanego na bakterie z gatunku <i>B. subtilis</i> .....	140
8. Dyskusja.....	151
9. Wnioski.....	170
10. Krótkie streszczenie pracy w języku polskim.....	171
11. Krótkie streszczenie pracy w języku angielskim .....	173
13. Wykaz rysunków i tabel .....	188
13.1. Spis rysunków .....	188
13.2. Spis tabel .....	190
14. Piśmiennictwo.....	192

## 1. Wprowadzenie

Bakterie są najmniejszymi istotami żywymi, występującymi wszędzie wokół nas w wielu formach i rodzajach. Ze względu na swoje mikroskopijne rozmiary, są trudnym materiałem do badań. Wymiary najczęściej spotykanych bakterii wahają się od jednego do paru mikrometrów. Do niedawna nasza wiedza o strukturze komórki opierała się na obserwacjach w mikroskopie świetlnym. Udoskonalenie technik mikroskopowych umożliwiło postęp w badaniach nad morfologią komórki i jej składnikami. Wprowadzenie mikroskopii elektronowej ogromnie powiększyło granice rozdzielczości, a zastosowanie przystawki kriogenicznej (Cryo-SEM) ułatwiło obserwację w stanie zbliżonym do naturalnego, bez potrzeby liofilizacji, delikatnych komórek bakteryjnych. Lata osiemdziesiąte XX wieku przyniosły wiele informacji na temat składu chemicznego i budowy struktur chroniących wnętrze bakterii od często zmiennego środowiska zewnętrznego. Dokładne poznanie natomiast właściwości powierzchni bakterii jest niezbędne do zrozumienia oddziaływań między nimi a środowiskiem, w którym występują.

Do badania składu chemicznego powierzchni bakterii, obok klasycznej analizy chemicznej, coraz częściej stosuje się nowoczesną aparaturę i techniki spektroskopowe, ponieważ same metody biologiczne nie dają takich możliwości. Spektroskopia umożliwia ocenę zmian w morfologii i składzie pierwiastkowym powierzchniowych warstw komórek bakterii. Pozwala także na pomiar zmieniającej się energii wiązania elektronów rdzenia, która spowodowana jest wpływem różnych warunków inkubacji, tym samym na wyznaczenie rodzaju wiązań chemicznych, w których biorą udział pierwiastki obecne na powierzchni. Zdobytą wiedzę można następnie wykorzystać w ocenie oddziaływania czynników środowiskowych i substancji toksycznych na komórki drobnoustrojów, gdyż zmiana składu chemicznego składników osłon komórkowych często jest odpowiedzią na zmieniające się warunki w środowisku.



## 2. Przegląd literatury

### 2.1. Charakterystyka *Procaryota*

Pojęcie *Procaryota* wprowadził Edouard Chatton w latach trzydziestych XX wieku do scharakteryzowania organizmów zaliczanych do drobnoustrojów. Nie jest ono pojęciem systematycznym (nazwa taksonu), a cechą charakteryzującą tę grupę. Organizmy prokariotyczne to w większości organizmy jednokomórkowe, nieposiadające wyodrębnionego jądra komórkowego oraz innych organelli komórkowych, charakterystycznych dla organizmów eukariotycznych [1, 2]. Zawierają jedynie kuliście zamkniętą cząsteczkę zwaną nukleoidem, która składa się z podwójnej helisy kwasu dezoksyrybonukleinowego, zanurzonego w cytoplazmie. Ten pojedynczy chromosom zawiera wszystkie niezbędne informacje do odtworzenia komórki. Ponadto w komórce może występować jedna lub więcej małych, kolistych cząsteczek DNA zwanych plazmidami. Komórka prokariotyczna natomiast nie zawiera wydzielonych organelli błonowych takich jak: centromeru i centrioli, wrzeciona mitotycznego, mitochondriów, plastyków, czy lizosomów [3]. Ich funkcje spełniają za to prościej ukształtowane cząstki cytoplazmatyczne lub funkcje te są rozdzielane na pozostałe układy komórkowe. Inaczej jest również zbudowana błona komórkowa, inny jest także skład ściany komórkowej, stosunkowo małe rybosomy (70S) oraz w inny sposób przebiega regulacja procesów komórkowych [4].

Istniejące mikroorganizmy możemy zaliczyć do trzech głównych domen:

- *Bacteria* lub *Eubacteria* (bakterie);
- *Archaea* (archeony);
- *Eucarya* lub *Eucaryota* (eukarionty).

Zarówno bakterie (*Bacteria*) jak i archeony (*Archaea*), mają cechy organizmów prokariotycznych, jednak są to dwie odrębne linie ewolucyjne. Niemniej jednak obie w całości zaliczane są do mikroorganizmów [2]. Domena *Archaea* jest natomiast grupą organizmów słabo zbadanych. Należą do niej wszystkie znane mikroorganizmy żyjące w warunkach ekstremalnych, np.: w gorących źródłach, wodach silnie zakwaszonych lub silnie alkalicznych. Od bakterii właściwych odróżnia je głównie budowa ściany komórkowej, która nie zawiera mureiny oraz obecność eterów rozgałęzionych nienasyconych kwasów tłuszczowych i glicerolu przy jednoczesnym braku fosfolipidów w błonie komórkowej. Te etery, przebiegające zwykle przez obie warstwy błony, powodują, że jest ona częściowo jednowarstwowa. Ściana komórkowa nie zawiera peptydoglikanów, jak również ich błona

cytoplazmatyczna nie zawiera kwasów tłuszczowych, a glicerol połączony jest wiązaniami eterowymi z izoprenoidami.

Istnieje również istotna różnica między bakteriami a archeonami, jeśli chodzi o organizację materiału genetycznego. U archeonów kwas DNA jest upakowany w nić nukleosomów, której rdzeń tworzą białka histonowe. Ponadto materiał genetyczny archebakterii jest nieciągły, to znaczy przedzielony intronami (np. intron - część sekwencji genu, dłuższa od egzonu, która nie koduje sekwencji polipeptydu, a jedynie rozdziela kodujące egzony). Introny występują w genach organizmów eukariotycznych, natomiast u prokariotów rzadko, jedynie w genach kodujących tRNA i rRNA. Archeowce są bardzo zróżnicowane zarówno pod względem morfologii jak i fizjologii. Niektóre żyją, jako pojedyncze komórki, inne tworzą nitki lub agregaty (kolonie). Mogą być sferyczne, pałeczkowate, spiralne lub płatowate. Średnica ich waha się od 0,1 do ponad 15  $\mu\text{m}$ , a włókna nawet osiągają do 200  $\mu\text{m}$ . Ich rozmnażanie jest również bardzo różnorodne. Może ono przebiegać poprzez podział, pączkowanie lub fragmentację [5].

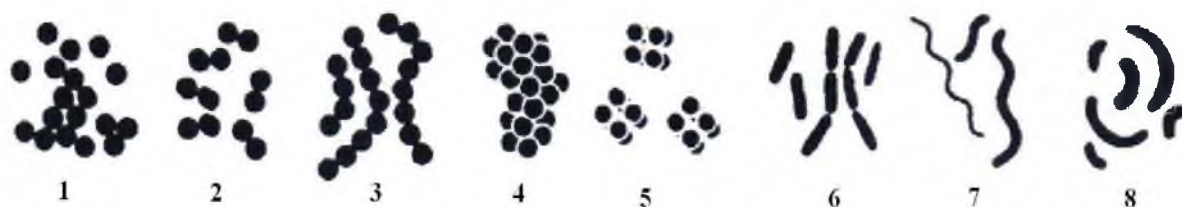
## 2.2. Morfologia bakterii

Typowa komórka bakteryjna ma zwykle średnicę ok. 1  $\mu\text{m}$  (tj.  $10^{-6}\text{ m}$ ), przy długości nieprzekraczającej 5  $\mu\text{m}$ . Spotyka się jednak również bakterie o mniejszych wymiarach, najmniejsze z nich np.: *Mycoplasmatales* lub tak zwane ciała elementarne form L bakterii mają rozmiary znajdujące się na granicy zdolności rozdzielczej mikroskopów świetlnych (ok. 0,15 – 0,2  $\mu\text{m}$ ) [6]. Z drugiej strony znane są również bakterie charakteryzujące się dużymi rozmiarami. Największym znanym obecnie gatunkiem bakterii jest *Thiomargarita namibiensis* ("siarkowa perła Namibii"), której komórka może osiągać nawet 2 mm długości [2, 5].

Małe wymiary komórek bakteryjnych pociągają za sobą pewne następstwa dla samego organizmu, mianowicie ograniczają one „pojemność” komórki bakteryjnej. Skutkiem małych rozmiarów komórek bakteryjnych jest ich maksymalnie uproszczona budowa wewnętrzna – brak jądra komórkowego i niektórych innych tworów obecnych w komórkach eukariotycznych, tym samym, mniej doskonały rozdział funkcji metabolicznych pomiędzy organelle komórkowe [2, 7].

### 2.2.1. Formy komórek bakteryjnych

Komórki bakterii, tak różnorodne pod względem funkcji życiowych, żyjące w zróżnicowanych środowiskach, są zadziwiająco proste, jeśli chodzi o kształt, w porównaniu z organizmami eukariotycznymi. Większość znanych bakterii ma kształt kulisty lub cylindryczny, chociaż zdarzają się formy o bardziej skomplikowanych kształtach – od wygiętych, poprzez spiralnie skręcone cylindry, aż do form rozgałęzionych, budową przypominających grzybnię. Ze względu, więc na kształt morfologiczny komórek bakteryjnych dzielimy je na trzy główne grupy: kuliste, podłużne i spiralne, które są charakterystyczne dla danego gatunku [2].



Rys. 1. Kształt komórek bakteryjnych [5].

Oznaczenia:

1 – komórka pojedyncza (*coccus*). 2 – dwoinka (*diplococcus*). 3 – paciorkowiec (*streptococcus*). 4 – gronkowiec (*staphylococcus*). 5 – pakietowiec (*sarcina*). 6 - komórki o formie prostego cylindra, przy czym rozróżniamy dwa typy takich bakterii; formy krótsze to pałeczki (*bacterium*), natomiast formy wydłużone to laseczki (*bacillus*). 7 - bakteria o kształcie cylindra spiralnie skręconego, czyli śrubowce (*spirillum*), u których liczba zwojów jest niewielka, bądź, jeżeli zwojów jest więcej, nazywane są krętkami (*spirochaetes*). 8 - przecinkowiec (*vibrio*), czyli bakteria o kształcie wygiętego cylindra [1].

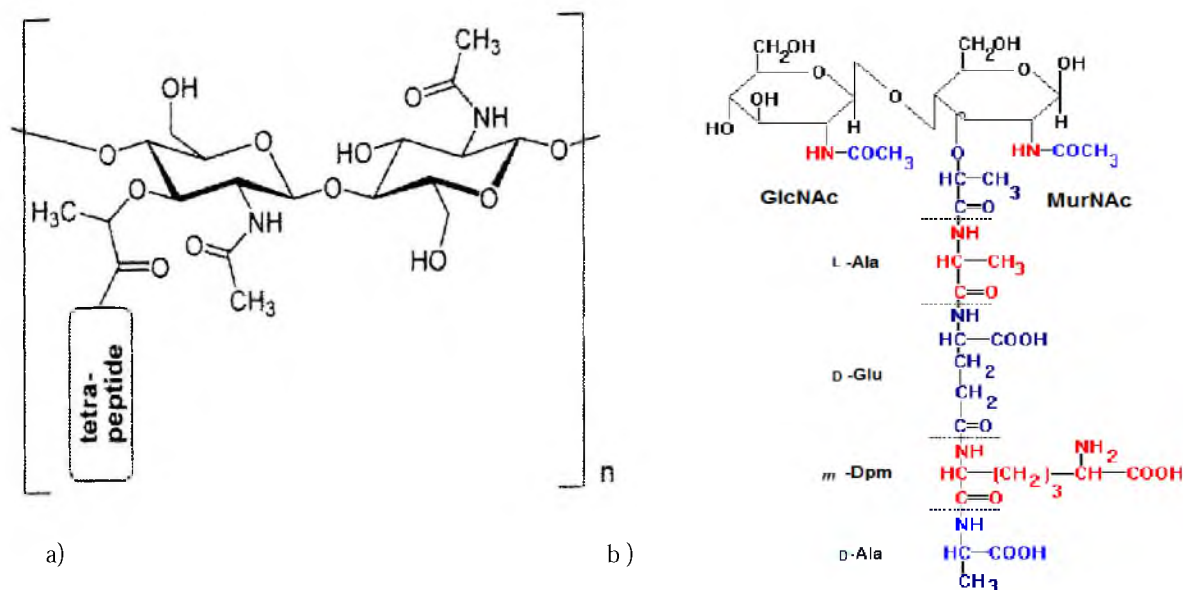
Dwie ostatnie grupy odróżnia także giętkość komórek. Śrubowce mają komórki sztywne, natomiast komórki krętek są niezwykle giętke [7]. Rzadziej występujące kształty bakterii to mające tendencję do zmiany kształtów maczugowce (*Corynebacterium*), nieregularnie cylindryczne, tworzące krótkie rozgałęzienia prątki (*Mycobacterium*) i tworzące długie, rozgałęzione nitki promieniowce (*Actinomyces*, *Streptomyces*, *Nocardia*). Znane są również bakterie o komórkach w kształcie rogalików (*Micrococcus*), kwadratowych, płaskich płytek (*Arcus*), a nawet gwiazdek (*Stella*). Najbardziej złożoną budowę mają sinice, niektóre bakterie siarkowe oraz bakterie śluzowe [2].

Bakterie rozmnażają się przez podział. Po tym procesie komórki potomne mogą się rozdzielić, jednak w wielu przypadkach zostają one połączone. Komórki takie tworzą wtedy charakterystyczne układy (pokazane na Rys. 1, w części od 2 do 5).

### 2.3. Ściana komórkowa

Każda komórka bakteryjna procaryota otoczona jest błoną cytoplazmatyczną, ale dodatkowo większość z nich chroniona jest również przez ścianę komórkową (wyjątek stanowią bakterie *Mycoplasmatales*). Jest ona elastyczną zewnętrzną osłoną komórki, stanowiącą strefę kontaktu ze środowiskiem. Chroni komórkę bakteryjną przed działaniem czynników zewnętrznych, takich jak: zmiany temperatury, wilgotności, ale także uszkodzeniami mechanicznymi. Stanowi barierę chroniącą również przed antybiotykami i detergentami oraz przed innymi mikroorganizmami [8]. Jest odpowiedzialna za utrzymanie kształtu komórki oraz odpowiedniego ciśnienia wewnątrzkomórkowego, czyli tzw. turgoru, niezbędnego do metabolizmu, wzrostu i podziału komórkowego [9]. Ściana komórkowa pełni także ważne funkcje przy transporcie jonów i innych cząsteczek do wnętrza komórki, przy czym jest całkowicie przepuszczalna dla soli i wielu innych substancji drobnocząsteczkowych [3, 4]. Bardzo ważne jest również kotwiczenie i stabilizacja struktur zewnątrzkomórkowych przez nią, przede wszystkim fimbrii i rzęsek oraz wiązanie u niektórych bakterii materiałów otoczkowych. Fizyczne właściwości ściany komórkowej pozwalające na spełnianie tych wszystkich funkcji to przede wszystkim jej elastyczność i wytrzymałość na rozciąganie [9, 10].

Ściany komórkowe różnych bakterii różnią się składem, strukturą oraz grubością, jednak ich podstawowym składnikiem zawsze jest peptydoglikan, zwany również mureiną. Jego schematyczny wzór przedstawiono na rysunku numer 2a. Jest to dość jednolity polimer składający się z liniowych łańcuchów heteropolisacharydów, połączonych poprzecznie krótkimi peptydami. Struktura ta tworzy trójwymiarową sieć otaczającą protoplast. W łańcuchach tej makrocząsteczki występują na przemian cząsteczki *N*-acetyloglukozaminy (GlcNAc) i kwasu *N*-acetylmuraminowego (MurNAc), które połączone są wiązaniami  $\beta$ -1,4 glikozydowymi [11].



Rys. 2. a) Schematyczny wzór monomeru peptydoglikanu [5]; b) Struktura mureiny *E. coli*.

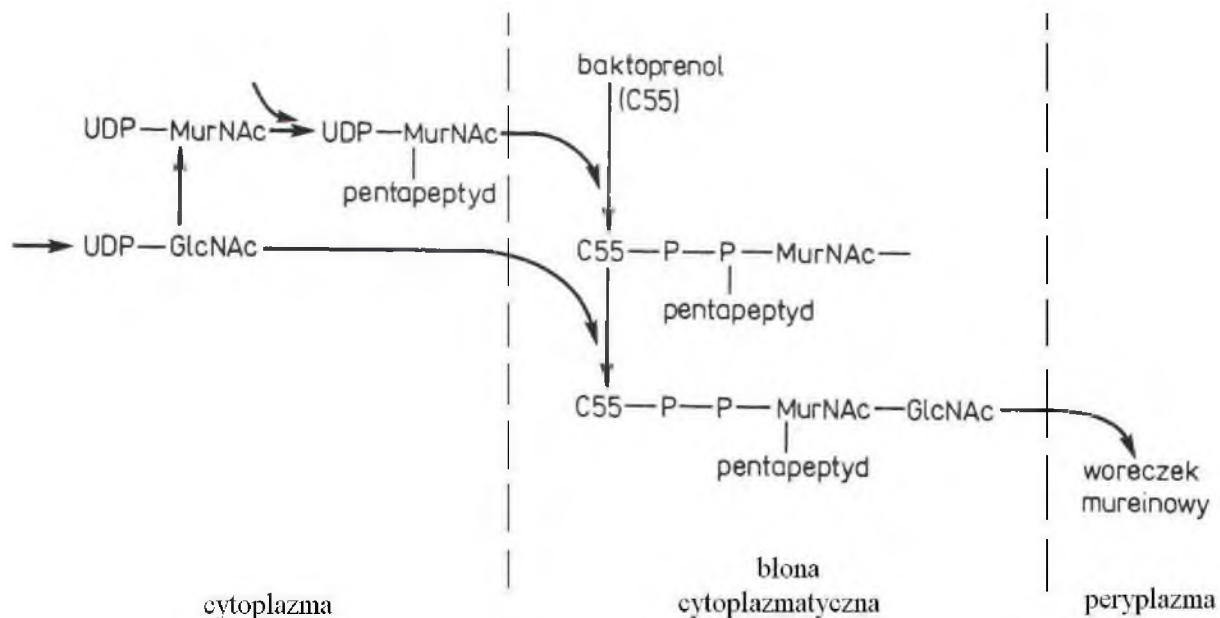
Poszczególne podjednostki kwasu muraminowego mają przyłączone do reszty mleczanowej, za pomocą wiązania peptydowego, krótkie peptydy, wiążące ze sobą łańcuchy wielocukrowe poprzecznymi mostkami. Dzięki temu powstaje rodzaj ciągłej sieci, zbudowanej z dość równolegle ułożonych polimerów wielocukrowych, związanych peptydami, różnymi w zależności od bakterii [2]. Typowe aminokwasy występujące w tych peptydach to *L*-alanina, kwas *D*-glutaminowy, kwas *mezo*-diaminopimelinowy ( $A_2pm$ ) lub *L*-lizyna oraz *D*-alanina [5]. Na rysunku 2b przedstawiono strukturę mureiny dla bakterii *Escherichia coli*.

Biosynteza mureiny jest złożonym procesem, w którym wyróżnia się trzy fazy (Rys. 3):

- 1) Synteza w cytoplazmie prekursorów peptydoglikanu – UDP - pochodne kwasu *N*-acetylmuraminowego (MurNAc) i *N*-acetylglukozaminy (GlcNAc);
- 2) Przenoszenie obu prekursorów na występujący w błonie komórkowej przenośnik lipidowy, który transportuje je przez błonę;
- 3) Prekursory na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej włączane są do istniejącej mureiny.

W trakcie biosyntezy mureiny, syntetyzowane są długie łańcuchy cukrowe, które w dalszej kolejności cięte są na krótsze przez autolityczne glikozydazy. Wolna grupa karbonylowa kwasu muraminowego w prekursorze mureiny jest akceptorem pierwszego z przyłączanych aminokwasów. Dalsze etapy tworzenia się prekursora prowadzą do przyłączania kolejnych aminokwasów, z których powstaje pentapeptyd. W zależności

od charakteru enzymu uczestniczącego w skracaniu łańcuchów, kończą się one zawsze resztą kwasu muraminowego z wolnym końcem redukującym, muramidazą lub kwasem 1,6-anhydromuraminowym (lityczna transglikozylaza). Podczas gdy budowa łańcucha cukrowego jest stała, jego część peptydowa wykazuje dość znaczne zróżnicowanie w zależności od wieku komórki, gatunku, a nawet od warunków wzrostu [11].



Rys. 3. Biosynteza mureiny [10].

Cukry w mureinie mogą podlegać różnego rodzaju modyfikacjom, które polegają na niepełnej *N*-acetylacji reszt kwasu muraminowego, wówczas obydwa aminocukry są częściowo pozbawione tych grup. Dzieje się tak na przykład u *Bacillus anthracis*, gdzie 88% reszt GlcNAc i 34% reszt MurNAc jest deacetylowanych. Wysoki stopień de-*N*-acetylacji kwasu muraminowego występuje u *Micrococcus luteus*. Innym typem modyfikacji cukrów jest modyfikacja występująca u prątków, gdzie reszty kwasu muraminowego nie są *N*-acetylowane, lecz podstawiane grupą glikolilową, która powstaje w wyniku utleniania grupy acetylowej. W efekcie, w mureinie tych bakterii występuje kwas *N*-glikolilomuraminowy (MurNGlyc). Wszystkie te modyfikacje następują na etapie prekursora, przed jego wbudowaniem do ściany komórkowej bakterii [3].

Ze względu na różnice w budowie ściany komórkowej, przede wszystkim ze względu na ich grubość, dzielimy bakterie na dwie odmienne grupy. Są to bakterie Gram-dodatnie oraz Gram-ujemne. Podział ten bezpośrednio wynika z innej u tych dwóch typów mikroorganizmów budowy ściany komórkowej. Różnice te dotyczą zarówno składu

chemicznego, jak i budowy przestrzennej [4]. Zostaną one szczegółowiej przedstawione w dalszej części pracy.

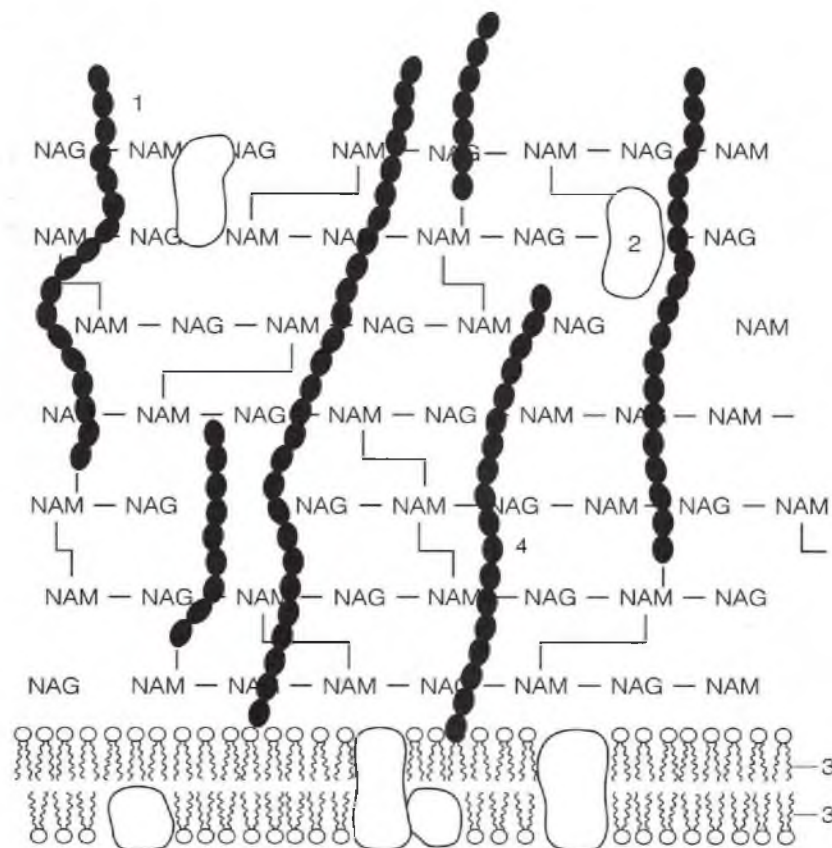
### 2.3.1. Warstwa S

U archeonów i licznych bakterii Gram-ujemnych (*Aeromonas salmonicida*, *Aquaspirillum serpens*) oraz niektórych bakterii Gram-dodatnich (np. *Bacillus*, *Corynebacterium*) występuje w osłonach bakteryjnych dodatkowa warstwa białkowa lub glikoproteinowa nazywana warstwą S (ang. *surface* – powierzchnia lub *S-layer*). Częsteczki budującego białka są często charakterystyczne dla danej bakterii i tworzą najbardziej zewnętrzną powierzchnię drobnoustrojów. Ułożone są bardzo regularnie, nadając warstwie charakter krystaliczny, a cała informacja o jej powstawaniu kryje się w monomerach białkowych lub glikoproteidowych (jest tworem samoorganizującym się). Monomery te często stabilizowane są wiązaniami wodorowymi i jonowymi oraz interakcjami hydrofobowymi. Czasem do stabilizacji wymagana jest również obecność jedno- lub dwuwartościowych kationów np.  $\text{Ca}^{2+}$  lub  $\text{Na}^{2+}$ . U bakterii Gram-dodatnich białka warstwy S układają się na ścianie zbudowanej z mureiny i polimerów towarzyszących, zaś u bakterii Gram-ujemnych na zewnątrz błony zewnętrznej, przyczepiając się do lipopolisacharydu. Jej grubość wynosi od 3 do 25 nm, spełniając w warunkach naturalnych funkcje mechanicznej ochrony komórki, a w przypadku archeobakterii również determinując ich kształt. Charakterystyczne, regularne ułożenie monomerów, z wytworzeniem porów określonej wielkości, pozwala również sądzić, że warstwa S może odgrywać rolę sita molekularnego, przepuszczającego cząsteczki tylko o określonej wielkości. Jednak w warunkach laboratoryjnych warstwa ta przestaje być syntetyzowana, co świadczy o tym, iż nie jest ona niezbędna do przetrwania komórki bakteryjnej [2, 3].

### 2.3.2. Budowa osłon komórkowych bakterii Gram-dodatnich

Bakterie Gram-dodatnie mają grubą, bo od 30 do 100 nm (część źródeł podaje 15-50 nm) ścianę komórkową o jednolitej strukturze. Jej większość, nawet do 80% całkowitej masy komórki, stanowi mureina, występująca w liczbie około 40 warstw [12]. Oprócz mureiny w ścianie komórkowej bakterii Gram-dodatnich znajdują się także inne związki chemiczne, są to m.in. kwasy tejchojowe, kwasy tejchuronowe, kwasy lipotejchuronowe, fosfolipidy, lipidy czy węglowodany. Polisacharydy natomiast występujące w ścianie komórkowej

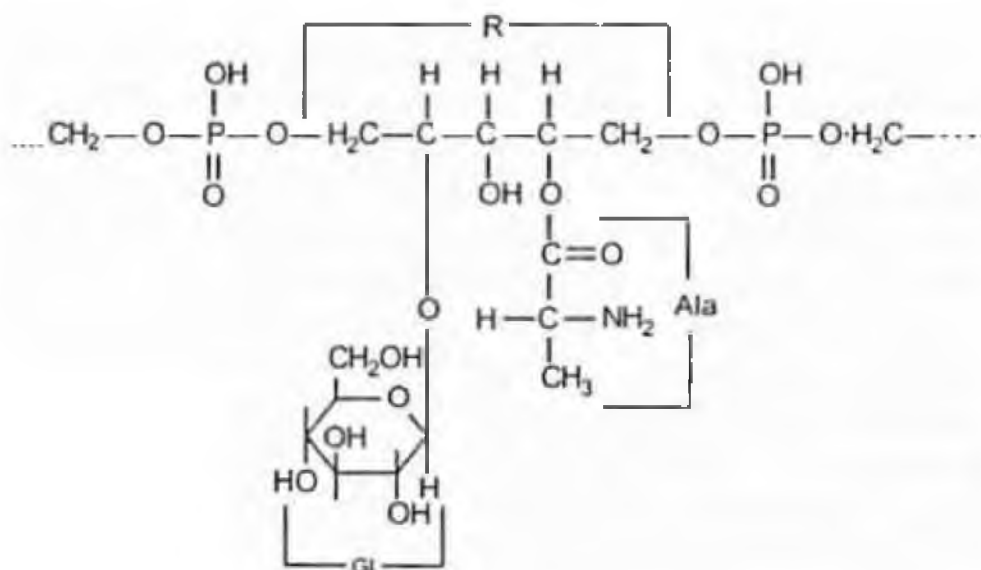
bakterii Gram-dodatnich są z nią związane kowalencyjnie, zaś zawartość w niej białek jest nieznaczna (Rys. 4).



Rys. 4. Schemat budowy ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich: 1- kwas tejchojowy, 2- białko związane z mureiną, 3- fosfolipidy, 4- kwas lipotejchojowy [3].

Do charakterystycznych składników w ścianie komórkowej bakterii Gram-dodatnich zaliczamy obecność polimerów wielocukrowych, takich jak kwasy tejchojowe, stanowiące do 50% suchej masy ściany. Są to łańcuchy złożone z 8 do 50 powtarzających się cząsteczek glicerolu lub rybitolu (fosforany polioli), połączonych mostkami fosfodiesterowymi. Mogą być one przyłączone do mureiny również za pomocą fosforanowych wiązań [4]. Na rys. 5 przedstawiono budowę kwasu tejchojowego u *Bacillus subtilis*.





Rys. 5. Budowa kwasu tejchojowego u *Bacillus subtilis*. R – rybitol, Gl – D-glukoza lub *N*-acetylo-D-glukozamina, Ala- reszta alaniny [2].

Kolejnym składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich są kwasy tejchuronowe, które pozbawione reszt fosforanowych są czasami syntetyzowane zamiast kwasów tejchojowych w warunkach głodu fosforanowego. Zwykle, bowiem w komórce jest syntetyzowany albo jeden, albo drugi z kwasów. Występują jednak wyjątki, jak np. szczepy *B. subtilis* i *B. licheniformis*, które syntetyzują oba rodzaje polimerów równocześnie [7]. Kwasy tejchuronowe są to długie polimery zbudowane z powtarzających się jednostek, zwykle naprzemiennie występującej reszty cukrowej i reszty kwasu uronowego, połączonych wiązaniami glikozydowymi (najczęściej kwasu *N*-acetylomannozaminouronowego lub kwasu glukuronowego). Grupom karboksylowym tego ostatniego kwasu polimery te zawdzięczają swój ujemny ładunek [12]. Funkcje tych kwasów polegają przede wszystkim na wzmacnianiu ściany komórkowej, stabilizacji osłon, jak również mają zdolność „wychwytywania” i przechowywania dwuwartościowych kationów metali.

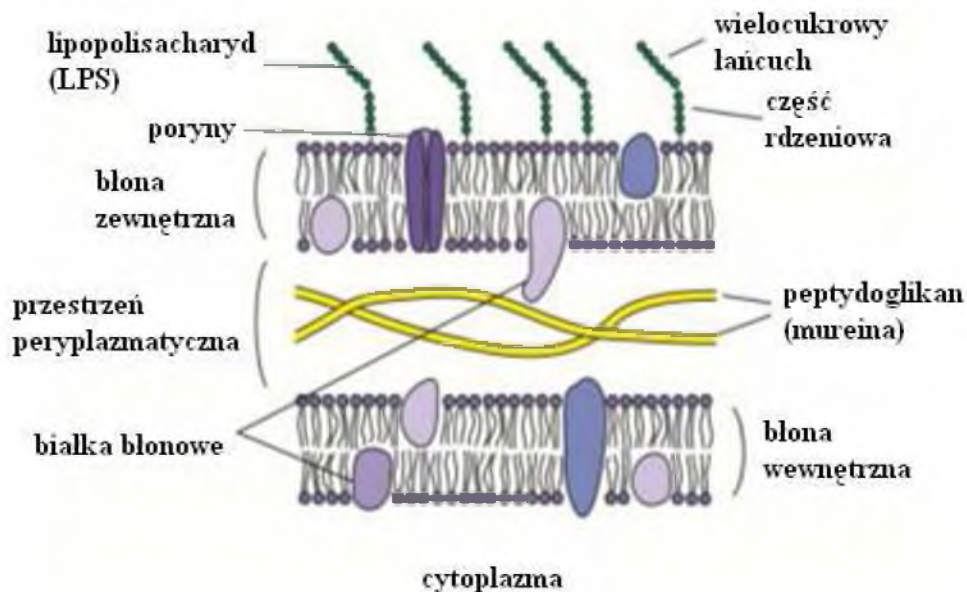
W ścianie wielu bakterii Gram-dodatnich występują także kwasy lipotejchojowe (LTA), podobnie zbudowane do kwasów tejchojowych. Ich cechą charakterystyczną jest zakotwiczenie częścią lipidową w błonie komórkowej, a nie w mureinie [2]. Kwasy tłuszczowe związane z glicerolem w części glikolipidowej tych kwasów mają skład niewiele różniący się od lipidów błony komórkowej, odzwierciedlając tym samym, błonowe pochodzenie tej części. Kwasy te mogą regulować aktywność komórkowych enzymów autolitycznych, a przede wszystkim podobnie jak lipopolisacharydy bakterii Gram-ujemnych wykazują szereg właściwości biologicznych, takich jak np. antygenowość (czyste preparaty

LTA wstrzyknięte myszom indukują wytwarzanie przeciwciał). Aktywują również monocyty i makrofagi, czy pośredniczą w adhezji bakterii do powierzchni komórek eukariotycznych [11]. Obydwa rodzaje tych kwasów (teichojowych i lipoteichojowych) przejawiają również silny polielektrolityczny charakter, przez obecność silnie kwasowych grup fosforanowych [13].

Ścianę komórkową bakterii Gram-dodatnich można usunąć przez działanie specjalnych enzymów, rozrywających wiązanie  $\beta$ -1,4 w mureinie. Jednym z takich enzymów jest lizozym, znajduje się on w wielu płynach ustrojowych, np. we łzach, ślinie oraz jest wytwarzany przez bakteriofagi. Komórka bakteryjna po usunięciu ściany przyjmuje postać kulistą i jest zwana protoplastem. Brak ściany komórkowej powoduje, że jest on bardzo wrażliwy na wartość osmotyczną ośrodka, w jakim się znajduje [2].

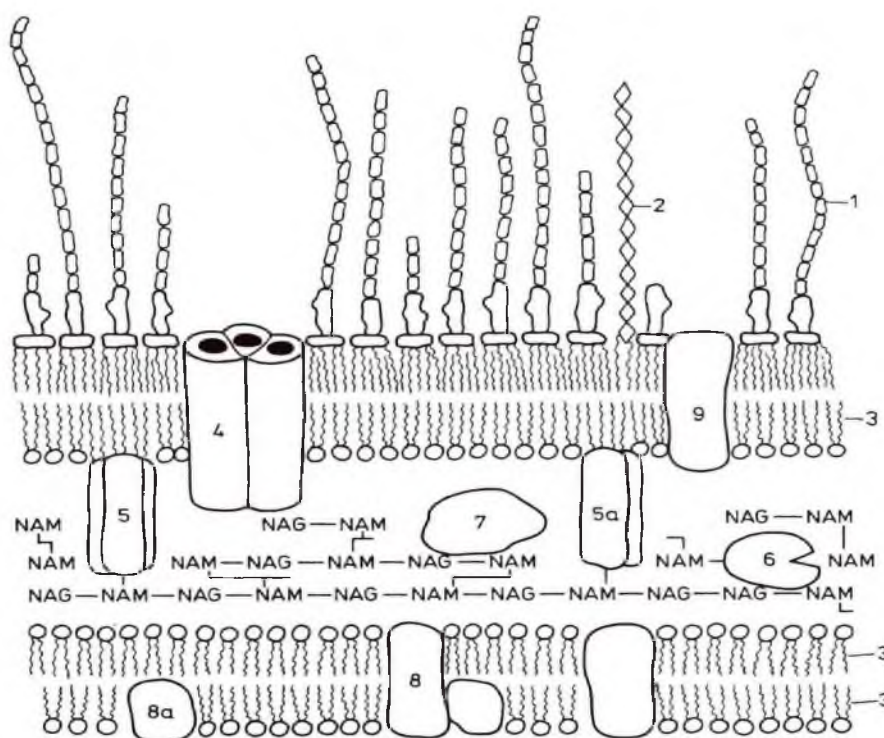
### 2.3.3. Błona zewnętrzna bakterii Gram-ujemnych

Ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych, w odróżnieniu od bakterii Gram-dodatnich jest o wiele cieńsza, gdyż jej grubość wynosi od ok. 2 do 30 nm (Rys. 6). Składa się z jednej lub maksymalnie trzech warstw mureiny i stanowi mniej niż 10% suchej masy komórkowej [3]. Nie kontaktuje się ona bezpośrednio ze środowiskiem zewnętrznym. Otoczona jest, bowiem dodatkową błoną, tzw. błoną zewnętrzną, zbudowaną z białek, fosfolipidów oraz lipopolisacharydu (LPS). Składniki te stanowią ponad 50% suchej masy błony [14]. Zawarte w niej fosfolipidy mają większą ilość kwasów tłuszczowych nasyconych, przy czym, stosunek ich zmienia się wraz ze zmianą temperatury środowiska. Ogólnie biorąc, im niższa temperatura poniżej optymalnej temperatury wzrostu, tym wyższa zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych i odwrotnie. Zmiany te pociągają za sobą zmianę stopnia płynności błony, ponieważ obniżona temperatura poniżej temperatury fizjologicznej powoduje odwracalną zmianę skupienia błony w kierunku fazy stałej. Pozwala to na optymalne spełnianie przez nią funkcji niezależnie od temperatury otoczenia. Zjawisko to nosi nazwę tranzykcji lub też potocznie zmiany fazy [14]. Fosfolipidy tworzą wewnętrzną warstwę błony zewnętrznej, zaś lipopolisacharydy (LPS) jej warstwę zewnętrzną. Taka budowa błony zewnętrznej sprawia, że jest ona słabo przepuszczalna dla detergentów, barwników, lizozymu oraz niektórych antybiotyków [3, 15]. Służy tym samym bakterii, jako filtr molekularny dla związków o charakterze hydrofilowym.



Rys. 6. Schemat budowy osłon komórkowych bakterii Gram-ujemnych [2].

W błonie zewnętrznej występują również liczne, przeważnie zintegrowane białka, które odgrywają ważną rolę w patobiologii bakterii Gram-ujemnych [16]. Charakterystyczną cechą tych białek jest to, iż są one na ogół pozbawione aktywności enzymatycznej. Ich rola polega głównie na stabilizacji struktury błony zewnętrznej. Niektóre z nich pełnią funkcje związane z adhezją komórek do różnych powierzchni lub też uczestniczą w dyfuzji pewnych substratów odżywczych do wnętrza komórki, równocześnie wykluczając wejście innym dużym lub hydrofobowym substancją. Do takich białek zaliczamy poriny (łac. *porus*-otwór) zarówno ogólne jak i specyficzne. Są to białka, które występują w zgrupowaniach po dwa lub trzy, tworząc kanały przechodzące przez błonę. Niektóre z tych białek są silnie związane z mureiną i stąd nazywane są białkami związanymi z mureiną (ang. *peptidoglycan associated proteins*) [17, 18]. Powierzchnia poriny jest stosunkowo niepolarna i oddziałuje z węglowodorowym rdzeniem błony, a wewnątrz kanału jest wyraźnie hydrofilowe i wypełnione cząsteczkami wody. Taka budowa jest związana z naprzemiennym występowaniem aminokwasów hydrofobowych i hydrofilowych wzdłuż każdej  $\beta$ -nici [19]. W niciach tego typu istnieje wyraźna tendencja, by hydrofobowe i hydrofilowe aminokwasy zajmowały sąsiadujące miejsca [14]. Ogólna zasada przepuszczalności jest taka, że hydrofilowe roztwory przechodzą przez pokryte wodą kanały porynowe, dlatego cząsteczki lipofilowe przechodzą przez kanały porynowe dużo wolniej [20]. Obecność cząsteczek wody wewnątrz kanału, jest konsekwencją występowania zasadowych i kwaśnych reszt aminokwasowych w przeciwstawnych miejscach kanału [21].



Rys. 7. Schemat budowy ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnej [3].

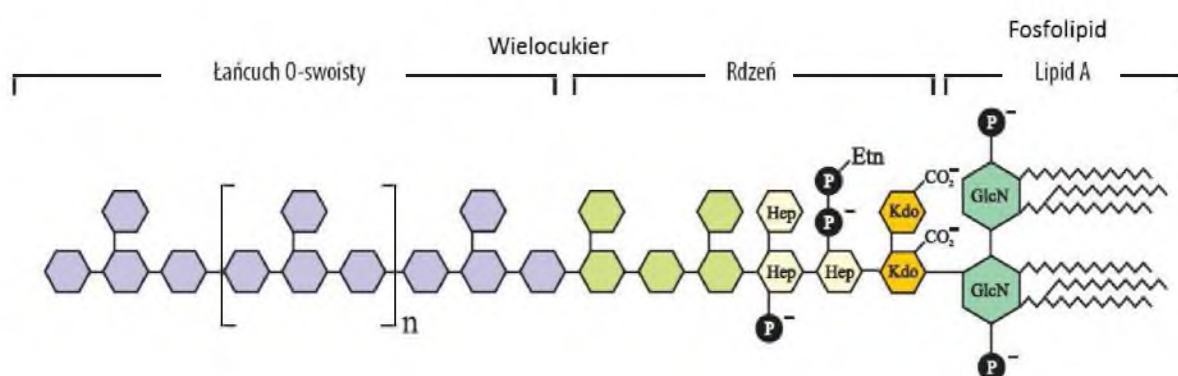
1 – lipopolisacharyd, 2 – enterobakteryjny wspólny antygen, 3 – fosfolipidy, 4 – poryna, 5 – lipoproteina Brauna (monomer), 5a – lipoproteina Brauna (dimer), 6 – peryplazmatyczne białko wiążące, 7 – białko peryplazmy, 8 i 8a – białka błony cytoplazmatycznej, 9 – nieporynowe białko błony zewnętrznej, NAG-NAM-mureina.

Do białek związanych z mureiną oraz wewnętrzną warstwą błony zewnętrznej należy również lipoproteina Brauna (Rys. 7). Jest ona związana z mureiną kowalencyjnie i podobnie jak inne białka osłon, syntetyzowana jest w postaci prebiałka (prolipoproteiny). U bakterii Gram-ujemnych te białka zanurzone są w fosfolipidowej warstwie błony zewnętrznej. Łączą one błonę zewnętrzną z pozostałą częścią ściany komórkowej, czyli mureiny [7]. Jej aktywność biologiczna związana jest natomiast z estrowo przyłączonymi łańcuchami kwasów tłuszczowych przy końcu N łańcucha polipeptydowego [12, 14]. Wiele z białek występuje w błonie w postaci monomeru, dimeru, pospolita jest również postać homotrimeru, a każdy monomer utworzony jest z określonej liczby  $\beta$ -nici [22].

Rola białek w błonie zewnętrznej jest bardzo zróżnicowana. Służą one również, jako receptory dla swoistych bakteriofagów oraz pełnią funkcje ochronne przed reakcjami immunologicznymi organizmu [22]. Jako cząsteczki wyeksponowane na powierzchni komórki białka są, tym samym, dobrymi immunogenami, stymulując odpowiedź immunologiczną gospodarza [23].

## Lipopolisacharyd – budowa

Lipopolisacharyd (LPS) to najbardziej aktywny biologicznie związek, występujący u bakterii Gram-ujemnych. Dla podkreślenia jego negatywnych działań nazwano go endotoksyną bakteryjną. LPS pokrywa około 75% powierzchni błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych i stanowi do 5% suchej masy komórki. Zawiaduje on prawidłowym rozmieszczeniem białek i fosfolipidów w ścianie komórkowej, zapewnia komórce bakteryjnej integralność i chroni ją przed ujemnym wpływem środowiska [24]. Lipopolisacharydy charakteryzują się wspólnym planem budowy u różnych gatunków bakterii. Pojedyncza cząsteczka LPS składa się z trzech odrębnych regionów różniących się budową chemiczną i właściwościami biologicznymi. Jest glikokoniugatem zbudowanym z lipidu A, oligosacharydowego rdzenia oraz polisacharydowego, wielocukrowego łańcucha O-swoistego (Rys. 8) [25]. LPS, zawierający te trzy jednostki, wytwarzany jest przez formy gładkie (S) bakterii, natomiast formy szorstkie bakterii (mutanty R) syntetyzują lipopolisacharyd pozbawiony części O-swoistej. Formy SR bakterii natomiast wytwarzają LPS składający się z lipidu A, rdzenia i jednej podjednostki O-swoistej [26].

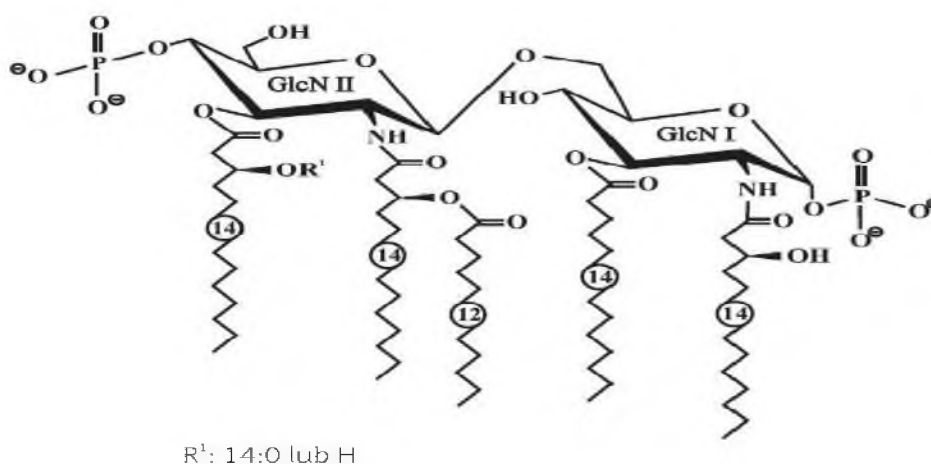


Rys. 8. Ogólny schemat budowy lipopolisacharydu LPS [25].

GlcN – glukozmina; Hep – heptozę; Kdo – kwas 2 keto-3-deoksyoktulozonowy. Symbole nieoznaczone – różnego typu cukry proste.

Lipid A leży najgłębiej LPS-u i zawiera część cukrową, zwykle złożoną z dwóch cząsteczek glukozaminy, połączonych wiązaniem 1,6 glikozydowym o charakterze hydrofobowym [3]. U różnych bakterii lipid ten może być acylowany różną liczbą łańcuchów kwasów tłuszczowych w części wielocukrowej oraz mogą występować w nim różne dodatkowe podstawniki. Tę komponentę cechuje międzygatunkowe, a nawet międzyszczepowe zróżnicowanie strukturalne. Przykładową budowę lipidu A u *E. coli*

przedstawiono na rys. 9. Unikatowa struktura lipidu A wyraża jego swoistą rolę w aktywności biologicznej LPS-u, będąc centrum toksyczności tej makrocząsteczki [27, 28]. Pełną aktywność endotoksyczną wykazują te drobnoustroje, których lipid A jest zbudowany tak jak lipid u bakterii *E. coli* lub też jest jego syntetycznym analogiem. W jego przypadku rdzeniem cukrowym są dwie cząsteczki D-glukozaminy (D-GlcN), połączone wiązaniem  $\beta 1 \rightarrow 6$  glikozydowym [29, 30]. Ten disacharyd podstawiony jest dwiema grupami fosforanowymi, gdzie jedna jest związana estrowo w pozycji 4' GlcN II, natomiast druga  $\alpha$ -glikozydowo w pozycji 1 GlcN I [31, 32]. W lipidzie A można wyróżnić w sumie trzy podregiony: disacharydowy komponent cukrowy, kwasy tłuszczowe oraz hydrofilowe podstawniki np. reszty fosforanowe. Fragment cukrowy lipidu A wykazuje najmniejszą zmienność strukturalną. Zwykle jest nim disacharyd zbudowany z dwóch cząsteczek glukozaminy połączonych wiązaniem  $\beta 1 \rightarrow 6$  glikozydowym [33, 34].



Rys. 9. Schemat budowy lipidu A *E. coli* [37].

Za lipidem A występuje część rdzeniowa R lipopolisacharydu, nazywana również oligosacharydem rdzeniowym lub z angielskiego *core*. W budowie rdzenia wyróżnia się część proksymalną do lipidu, czyli rdzeń wewnętrzny i część dystalną tzn. rdzeń zewnętrzny. Część rdzeniowa R jest elementem łączącym lipid A z łańcuchem O-swoistym, która składa się z trzech reszt kwasu 2-keto-3-deoksyoktonowego (Kdo), dwóch cząsteczek heptozy oraz zewnętrznej części rdzenia. Obecność kwasu Kdo świadczy o jego ważnej roli w życiu bakterii, gdyż dotychczas nie udało się uzyskać mutantów pozbawionych tego regionu [35-37]. Przeważnie w LPS występują dwie reszty Kdo, które mogą zostać zastąpione przez inny podobny cukier: kwas D-glicero-D-talooktulozonowy, nazywany w skrócie Ko.

Struktura rdzenia zewnętrznego, zwanego również regionem heksozowym, zbudowana jest z rozgałęzionych łańcuchów glukozy, galaktozy i N-acetyloglukozaminy. Rdzeń ten jest bardziej zmienny niż rdzeń wewnętrzny (zbudowany z Kdo, heptozy, etanoloaminy i fosforanu) [38].

Łańcuch O-swoisty (nazywany także antygenem O) jest najbardziej zewnętrznym elementem błony otaczającej komórkę, łączącym się z rdzeniem zewnętrznym. Może zawierać pentozy, heksozy, aminocukry, pochodne metylowe cukrów i kwasy uronowe. Charakteryzuje się największą heterogennością spośród wszystkich trzech elementów budujących LPS. Rodzaj cukrów, których dla różnych gatunków bakterii wykryto ponad 40, ich sekwencja, konfiguracja anomeryczna i typ wiązania jest cechą charakterystyczną dla antygeny O danego serotypu szczepu. O-swoiste łańcuchy cukrowe są bezpośrednio przyłączone do rdzenia i składają się z długich łańcuchów powtarzających się oligosacharydów, połączonych liniowo bądź w sposób rozgałęziony [35, 39].

### **Lipopolisacharyd - synteza i rola biologiczna**

Synteza LPS ma miejsce w cytoplazmie i przebiega w kilku etapach. Pierwszym z nich jest synteza lipidu A, do którego następnie przyłączany jest fragment polisacharydowy zbudowany z regionu rdzeniowego, a także powtarzające się podjednostki cukrowe wchodzące w skład O-antygeny. W większości lipidów A warunkiem koniecznym prowadzącym do powstania szkieletu cukrowego jest kondensacja lipidu X z cząsteczką UDP-2,3-diacetyloglukozaminy i utworzenie pomiędzy nimi wiązania  $\beta 1 \rightarrow 6$  glikozydowego [27]. Za ten etap odpowiada syntaza disacharydowa lipidu A (LpxB), a końcowym etapem biosyntezy jest przyłączenie kolejnych łańcuchów kwasów tłuszczowych [3, 28].

Do zsyntezowanej struktury lipidu A i jednej lub kilku cząsteczek Kdo przyłączane są kolejne składowe rdzenia. Biosynteza rdzenia rozpoczyna się od izomeryzacji sedoheptulozo-7-fosforanu, w wyniku kolejnych przekształceń powstaje ADP-L-*glicero-D-manno*-heptosa [30]. Po dodaniu wszystkich obecnych w danym szczepie komponentów siedmiowęglowych wraz z ich podstawnikami przyłączane są reszty sześciowęglowe. U wszystkich szczepów *Salmonella* i *E. coli* pierwszą resztą tego fragmentu jest reszta glukozy [27]. Ostatnim etapem w biosyntezie LPS jest synteza podjednostek budujących łańcuch O-swoisty. W czasie biosyntezy, podjednostki ulegają blokowej polimeryzacji a następnie przyłączane są do rdzenia [31]. Lipid A z częścią rdzeniową jest w dalszej kolejności transportowany przez błonę komórkową na jej powierzchnię



peryplazmatyczną, gdzie zostaje połączony z gotowym polisacharydem O. Tak zszyntezowane cząsteczki LPS muszą się przedostać przez peryplazmę i błonę zewnętrzną do jej zewnętrznej warstwy [3].

LPS pełni ważną funkcję biologiczną w przebiegu procesów życiowych bakterii Gram-ujemnych. Pokrywając powierzchnię komórki bakteryjnej ma on bardzo duże znaczenie w utrzymaniu odpowiedniej przepuszczalności błony komórkowej oraz stanowi barierę przed wnikaniem do komórki wysokocząsteczkowych substancji, takich jak antybiotyki, substancje toksyczne czy sole kwasów żółciowych. Jest również odpowiedzialny za część objawów chorobowych obserwowanych w czasie zakażeń wywoływanych przez bakterie [21, 22]. LPS bowiem, jako najbardziej efektywna endotoksyna wywołuje szeroką gamę oddziaływań biologicznych, zależnie od gatunku np. zwierzęcia, jak i od szczepu bakteryjnego, będącego dawcą LPS. Do efektów biologicznych jego działania należą: wzrost temperatury ciała, stan zapalny, hiperglikemia, nadciśnienie płucne, szok, całkowite wyczerpanie, krwawienie, co często może prowadzić do śmierci [40, 41].

U nielicznych bakterii zamiast lipopolisacharydów występują skrócone i prostsze formy, zwane lipooligosacharydami (LOS). Są one cząstkami podobnymi do LPS, ale pozbawione łańcucha O-swoistego [3].

### **Przestrzeń peryplazmatyczna**

Pomiędzy błoną zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych, a błoną komórkową występuje obszar nazywany przestrzenią peryplazmatyczną. Precyzyjne określenie granic tego obszaru nie jest łatwe, ale przyjmuje się, że obejmuje ona również wszystkie białka związane z tymi obiema stronami błon. Przestrzeń ta ma grubość około 15 nm i zawarta jest w niej znaczna ilość nie tylko białek, ale i enzymów oraz oligosacharydów [25, 42]. Białka peryplazmy pełnią ważną funkcję w ochronie komórki przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi (np. białka rozkładające penicylinę). Degradują duże i trudno przechodzące przez błonę zewnętrzną cząsteczki do produktów mogących łatwiej przedostać się do cytoplazmy oraz uczestniczą w transporcie odżywczych składników do wnętrza komórki (duże białka funkcjonujące w systemie permeaz tzw. transportu wrażliwego na szok osmotyczny) [3, 12, 22]. Oligosacharydy przestrzeni peryplazmatycznej noszące nazwę błono pochodnych (MDO, *Membrane Derived Oligosaccharides*) chronią komórkę bakteryjną przed osmotycznymi zmianami środowiska [12].



## 2.4. Otoczki bakteryjne

Większość bakterii wytwarza zewnątrzkomórkową warstwę substancji wielocukrowej lub polipeptydowej, która może albo bardzo luźno przylegać do komórki lub być z nią mocno związana. Niejednokrotnie, tworzy ona z zewnątrz dodatkową warstwę ochronną i nazywana jest otoczką lub warstwą substancji śluzowej. Warstwa śluzowa, czyli wodnista wydzielina, swobodnie przylegająca do powierzchni ściany komórkowej, może być niekiedy tak cienka (10-30 nm), że nie jest dostrzegalna przy obserwacji mikroskopowej. Może być ona wykryta jedynie metodami chemicznymi i serologicznymi [3]. Otoczkami natomiast nazywamy grubą warstwę takiego śluzu, która chroni komórki przed wysychaniem, stanowi rezerwę składników pokarmowych oraz może chronić przed substancjami działającymi na bakterie toksycznie. W przeciwieństwie do śluzów otoczki są ściśle związane z powierzchnią komórki. Dodatkowo odpowiedzialne są za zjawisko adhezji, umożliwiając przywieranie komórek bakteryjnych do różnych powierzchni. Od nich także zależy chorobotwórczy charakter mikroorganizmów, gdyż bakterie bezotoczkowe zazwyczaj są bakteriami niepatogennymi [5, 43].

Otoczki to struktury, które zawierają bakteryjne egzopolimery lub też zewnątrzkomórkowe substancje polimeryczne, nazywane EPS (ang. *extracellular polysaccharides*; *exopolysaccharides*). EPS to produkty metaboliczne akumulowane na powierzchni komórki, które zawierają różnego rodzaju substancje organiczne, takie jak egzopolisacharydy, egzoproteiny, kwasy uronowe, kwasy humusowe itd. Stanowią specyficzny rodzaj ochrony dla komórki [41]. Otoczki natomiast utworzone są przede wszystkim z wody i polimerów cukrów, aminocukrów lub kwasów uronowych, i połączone są ze ścianą komórkową za pomocą wiązań jonowych lub kowalencyjnych. Takie łańcuchy wielocukrowe, mają zwykle ujemny ładunek elektryczny i powiązane są między sobą jonami wapnia lub magnezu. Innym istotnym składnikiem otoczek jest fosforan, który występuje również, jako łącznik fosfodiesterowy pomiędzy cukrami, albo jako podstawnik w szkieletcie cukrowym [11]. U niektórych form, np. u laseczki *B. subtilis*, materiał otoczkowy zbudowany jest z polipeptydów, izomerów szczególnie mieszaniny izomerów  $D$  i  $L$  kwasu glutaminowego [3]. Wiele szczepów *E. coli* wytwarza charakterystyczny EPS, nazywany kwasem kolaninowym lub antygenem M i zbudowany jest z glukozy, galaktozy oraz fukozy. Jego synteza zwykle zachodzi w temperaturze poniżej 30°C i pełni ważną rolę w tworzeniu biofilmów przez ten gatunek bakterii w środowisku naturalnym. Zatem budowa chemiczna otoczek jest bardzo zróżnicowana i nawet w obrębie jednego gatunku można wyróżnić wiele

ich typów (różne szczepy *E. coli* wytwarzają ponad 80 różnych wielocukrowych otoczek) [43]. Dokładne poznanie składu śluzowej otoczki bakteryjnej jest bardzo pomocne przy identyfikacji i klasyfikacji szczepów bakterii, gdyż zwykle różne gatunki mikroorganizmów mają charakterystyczne tylko dla siebie otoczki [5].

W życiu bakterii śluz otoczkowe odgrywają znaczącą rolę. Przede wszystkim oprócz ułatwienia bakteriom przetrwanie okresu suszy, chronią je przed licznymi innymi szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi. Obecność bakteryjnych egzopolimerów ma też poważny wpływ na dyfuzję różnych molekuł zarówno do, jak i z komórki. Chronią również komórki przed bakteriofagami, antybiotykami i np. metalami ciężkimi. U bakterii chorobotwórczych np. u *Streptococcus pneumoniae* (dwoinka zapalenia płuc) chronią przed fagocytozą, dzięki czemu może rozmnażać się w organizmie człowieka, powodując chorobę.

Tworzenie otoczek węglowodanowych może też mieć znaczenie regulacyjne, jako pewnego rodzaju namiastka wydalania. Zbędna ilość zasymilowanych cukrów lub związków pokrewnych, niezuzyta na budowę protoplazmy lub w procesach oddechowych, zostaje przerobiona na pozakomórkowy śluz, być może odgrywający rolę materiału zapasowego. Tym samym, otoczki i warstwy śluzu są składnikami kształtującym stosunek bakterii do otoczenia i w wielu środowiskach są niezbędne do przeżycia i rozwoju bakterii. Rola otoczek bakteryjnych w dużym stopniu zależy, zatem od naturalnego środowiska danej bakterii, ponieważ syntetyzowane są one najczęściej, jako odpowiedź na selektywne naciski wywierane przez otoczenie. Trzeba jednak pamiętać, że w większości przypadków mogą być usunięte z komórki bez naruszenia jej funkcji życiowych [3].

## 2.5. Powietrze, jako środowisko życia bakterii

Bakterie żyją w bardzo różnorodnych środowiskach: w glebach, wodach, powietrzu, podziemnych źródłach, w kopalniach, złożach ropy naftowej oraz organizmach roślin, zwierząt i ludzi. Są jednak organizmami wyspecjalizowanymi, co oznacza, że konkretny gatunek bakterii znaleźć można we właściwym tylko dla niego środowisku. Zespół mikroorganizmów zasiedlający dane środowisko nazywany jest jego mikroflorą [4].

Powietrze atmosferyczne jest środowiskiem, które nie sprzyja życiu mikroorganizmów, ponieważ nie mogą one w nim ani rosnąć, ani też dzielić się. Jest ono, więc jedynie miejscem ich tymczasowego przebywania, a także ośrodkiem umożliwiającym przemieszczanie się. Ilość drobnoustrojów zawieszonych w powietrzu zależy od kilku podstawowych czynników, takich jak:

- warunki środowiska;
- pory roku (w niższej temperaturze stężenie mikroorganizmów jest mniejsze);
- strefy klimatyczne (najwięcej mikroorganizmów znajduje się w strefie tropikalnej);
- wysokość (najwięcej występuje w pobliżu gleby, czym wyżej tym mniej drobnoustrojów zawieszonych w powietrzu);
- rodzaj atmosfery/miejsca (powietrze w miastach zawiera więcej bakterii niż powietrze na wsiach, polach lub lasach).

Mikroorganizmy dostają się do powietrza przede wszystkim dzięki podmuchom wiatru z różnych źródeł, takich jak: gleby, wody, powierzchnie roślin i zwierząt, a także mogą być aktywnie wyrzucane w powietrze w wyniku kaszlu lub kichania [44]. Muszą być one odporne na stały niedobór wody w powietrzu, grożący wyschnięciem i uniemożliwiający im prowadzenie procesów życiowych. Także brak wystarczającej ilości składników pokarmowych oraz wpływ promieniowania słonecznego utrudnia drobnoustrojom przetrwanie w tym środowisku. Wirusy zwykle są mniej wrażliwe na te specyficzne warunki niż bakterie, natomiast spośród form wegetatywnych bakterii większą wytrzymałością charakteryzują się bakterie Gram-dodatnie niż Gram-ujemne, ze względu na ich grubszą ścianę komórkową. Do najczęściej występujących form mikroorganizmów w powietrzu należą:

- zarodniki grzybów;
- wirusy;
- formy przetrwalne bakterii;
- formy wegetatywne bakterii [44].

Na przeżywalność drobnoustrojów w powietrzu wpływają również warunki meteorologiczne, jak: wilgotność, temperatura, czas przebywania w atmosferze, odporność danego gatunku oraz zanieczyszczenia powietrza. Węglowodory, tlenki azotu oraz ozon obecne w atmosferze, działają toksycznie na wszystkie formy życia, także na mikroorganizmy zawieszone w powietrzu, z kolei aerozole niebiologiczne (pyły zawieszone) rozpraszają i absorbują promieniowanie słoneczne, co zwiększa ich szansę na przeżycie [11].

Bakterie w powietrzu często występują w postaci bioaerozoli tzw. aerozoli biologicznych, które tworzą układy dwufazowe, składające się z zawieszonych w fazie gazowej cząstek biologicznych (np. wirusy, bakterie, grzyby mikroskopijne i ich zarodniki) lub też fragmentów żywych organizmów (martwe komórki zwierząt) i roślin (pyłki kwiatowe, spory mchów i paprotników, grzyby mikroskopijne, strzępki pleśni) [45]. Cząstki te po

przejściu w postać aerozolu, tzn. pozostając zawieszone w powietrzu, mogą być zarówno żywe, jak i martwe. Mogą występować, jako samodzielne cząstki biologiczne lub przyczepiać się do powierzchni pyłów utworzonych z materii nieożywionej [46, 47].

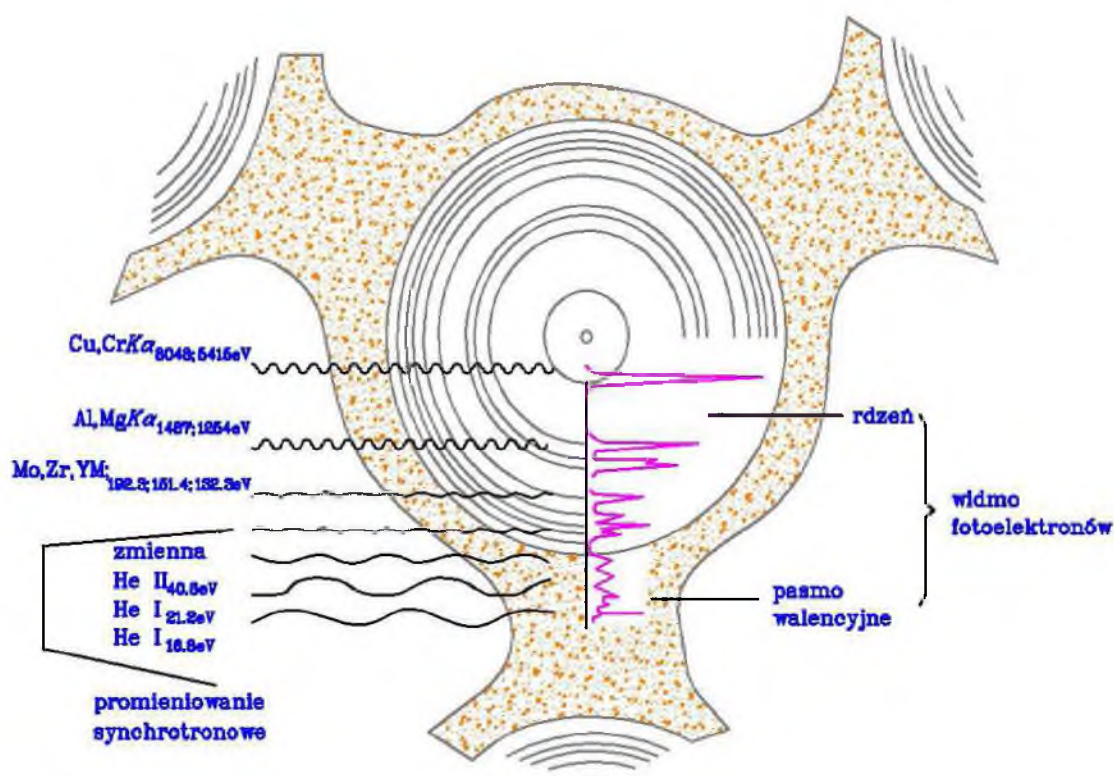
Większość cząstek biologicznych nie stanowi zagrożenia zdrowotnego w normalnych warunkach środowiskowych, czyli przy stosunkowo niskich stężeniach. Trzeba jednak zwrócić uwagę, że część z nich może wykazywać właściwości chorobotwórcze, alergizujące lub toksyczne [49]. Dlatego też, badania aerozolu biologicznego są niezwykle ważne. W skład takiego aerozolu mogą, bowiem wchodzić groźne bakterie chorobotwórcze, wnikające do układu oddechowego, takie jak np.: *Streptococcus pneumoniae* wywołujące zapalenie płuc, czy *Mycobacterium tuberculosis* powodujące gruźlicę. Do mikroorganizmów przejawiających działanie alergizujące i toksyczne, które mogą być efektem inhalacji zarówno żywych, jak i martwych komórek aerozolu biologicznego należą grzyby, pyłki roślinne i zwierzęce oraz wytwarzane przez nie substancje (endotoksyny, peptydoglikany, glukany, mikotoksyny).

Nie tylko stężenie, ale także skład chemiczny cząstek biologicznych zawieszonych w powietrzu, skład gatunkowy (w wypadku aerozolu grzybowego oraz bakteryjnego) oraz wielkości cząstek mają duży wpływ na zdrowie ludzi. Przy czym, wielkość cząstek bioaerozoli mieści się w szerokim zakresie, od nanometrycznych (np. endotoksyny bakteryjne), poprzez submikronowe (np. fragmenty komórek bakteryjnych lub grzybowych), po cząstki, których średnica może przekraczać 100  $\mu\text{m}$  (np. pyłki roślin) [48]. Wielkość cząstek aerozolu ma bezpośredni wpływ na miejsce depozycji danej cząstki w organizmie, a dokładniej w układzie oddechowym człowieka. Zazwyczaj cząstki o średnicy aerodynamicznej większej od 10  $\mu\text{m}$  uważa się za nieszkodliwe, nie mają one, bowiem możliwości odkładania się w układzie oddechowym. Cząstki o wielkościach od 5 do 10  $\mu\text{m}$  odkładają się w gardle i jamie nosowej, a jeśli są cząstkami o właściwościach alergizujących wywołują astmę i alergiczny nieżyt nosa. Z kolei cząstki mniejsze, o średnicy aerodynamicznej w zakresie od 1 do 5  $\mu\text{m}$ , przenikają do płuc i osadzają się w pęcherzykach płucnych, co może wywołać poważną chorobę - alergiczne zapalenie płuc. Najdrobniejsze cząstki nazywane frakcją respirabilną (średnia wartość średnicy aerodynamicznej cząstki frakcji respirabilnej wynosi 3,5  $\mu\text{m}$ ), tym bardziej negatywnie działają na zdrowie im większy jest ich udział procentowy w ogólnej zawartości aerozolu w powietrzu [48].

### 3. Spektroskopia fotoelektronów wzbudzonych promieniowaniem rentgenowskim XPS

Spektroskopią nazywamy badania oddziaływania promieniowania korpuskularnego lub elektromagnetycznego z materią, w skali mikro lub makroskopowej. Promieniowanie to może być pochłaniane (spektroskopia absorpcyjna) lub emitowane (spektroskopia emisyjna) przez materię, z której zbudowana jest próbka, w nieciągłych porcjach (kwanty energii). Badając ich częstość możemy określić poziomy energetyczne badanego materiału, a tym samym, określić zmiany energii będące skutkiem oddziaływania promieniowania z materią. Każdy układ materialny ma, bowiem charakterystyczne dla siebie poziomy energetyczne [49].

Większość metod używanych do badania powierzchni ciał stałych wykorzystuje efekty oddziaływania elektronów, fotonów, jonów (dodatnich lub ujemnych) lub neutronów z atomami badanej próbki [50]. W spektroskopii fotoelektronów rejestracji podlegają elektrony wyemitowane z powierzchni i warstwy przypowierzchniowej analizowanej substancji. Emitowane są one pod wpływem oświetlania jej fotonowym promieniowaniem jonizującym o znanej energii kwantów. Liczba wyemitowanych elektronów jest następnie analizowana w funkcji ich energii kinetycznej [51].



Rys. 10. Obszary energii wiązania dostępne za pomocą fotonów o różnych energiach [52].

Spektroskopia fotoelektronów PES (*Photoelectron Spectroscopy*) oparta jest na pomiarze rozkładu energetycznego elektronów emitowanych z materiału naświetlonego fotonowym promieniowaniem jonizującym, takim jak: promieniowanie rentgenowskie, nadfioletowe lub synchrotronowe. W ramach PES rozróżnia się: spektroskopię UPS (*Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy*) i spektroskopię XPS (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*). Obie te techniki odróżnia inna energia wzbudzenia, ponieważ mechanizm emisji fotoelektronów ściśle zależy od tej wartości. Ich porównanie przedstawiono w tabeli numer 1 [51, 52].

Tabela 1. Porównanie spektroskopii UPS i XPS.

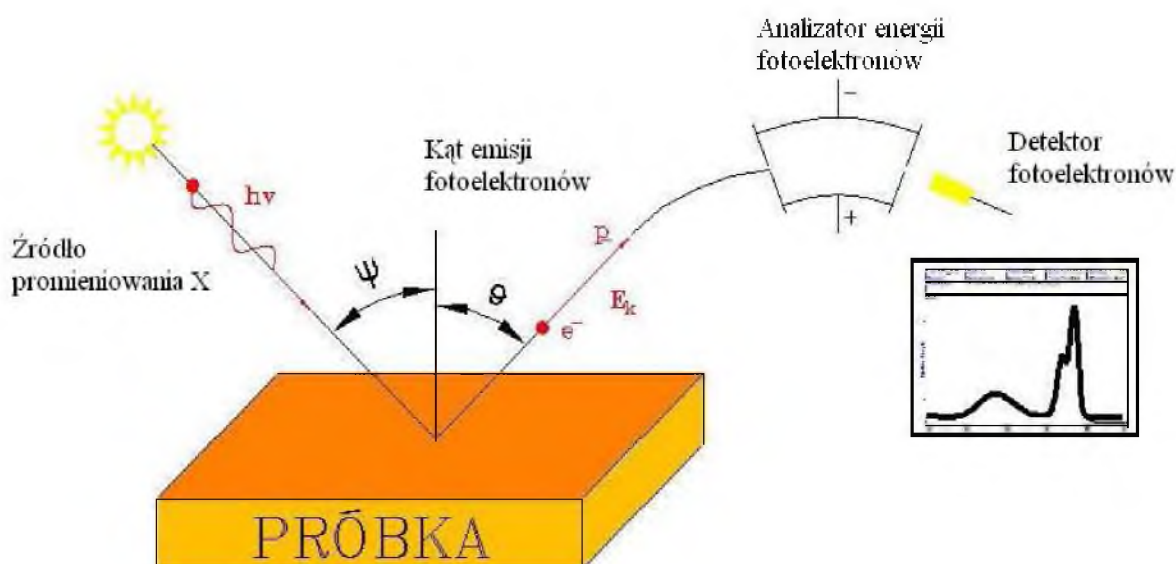
Nazwa techniki	Energia wzbudzenia [eV]	Długość fali [Å]	Mechanizm emisji fotoelektronów	Główne zastosowanie
<b>Spektroskopia UPS</b> (z ang. <i>Ultraviolet Photoelectron Spectroscopy</i> )	10-150	100 - 1 000	Fotojonizacja elektronów pasma walencyjnego połączona z emisją fotoelektronów z obszaru przypowierzchniowego	Badanie elektronów emitowanych z pasma walencyjnego
<b>Spektroskopia XPS</b> (z ang. <i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i> )	150-3 000	5-100	Fotoemisja elektronów z głębokich poziomów energetycznych oraz z pasma walencyjnego (tylko dla wybranych wartości energii fotonów, odpowiadających promieniowaniu charakterystycznemu materiałów anody lamp rentgenowskich)	Badanie elektronów emitowanych z głębokich stanów rdzeniowych, znajdujących się wewnątrz atomu

Ze względu na zastosowanie oba rodzaje spektroskopii (UPS i XPS) występują w literaturze oddzielnie. Oprócz tego, że różnią się energią padających fotonów, ich idea fizyczna jest wspólna i opiera się na zjawisku fotoelektrycznym odkrytym przez Hertza w 1887 roku [52]. Rok ten przyjmuje się za początki tej metody, gdzie w 1905 efekt fotoelektryczny został w rewolucyjny sposób objaśniony przez Alberta Einsteina. Otworzyło to nowy dział badań fizyki kwantowej w atomowej skali, a jego hipoteza o kwantowej naturze promieniowania elektromagnetycznego umożliwiła mu podanie prawa opisującego efekt fotoelektryczny, za którą w 1921 roku dostał Nagrodę Nobla [52, 53]. W latach między-

wojennych H. Robinson (Anglia) i M. de Broglie (Francja) używali analizatorów magnetycznych, które rejestrowały fotoelektrony na błonach fotograficznych. Jednak dopiero pionierskie badania Kai Siegbahn'a (Szwecja) w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych XX wieku na uniwersytecie w Uppsali pozwoliły na otrzymanie pierwszych wysokorozdzielczych widm fotoelektronowych (1954 rok – pierwsze widmo XPS z chlorku sodu). Kai Siegbahn za opracowanie podstaw teoretycznych, budowę pierwszej aparatury do badań oraz ogólny wkład w rozwój metod badawczych otrzymał w 1981 roku również nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki [52, 53]. Jednakże słaba zdolność rozdzielcza ówczesnych spektrometrów znacznie ograniczała możliwość odczytywania wielu informacji z widm elektronów. Rozwój spektroskopii fotoelektronów, zatem był ściśle związany z rozwojem metod monochromatyzacji promieniowania oraz techniki wysokiej próżni. Za datę praktycznego wykorzystania tej metody do badań materiałowych przyjmuje się lata siedemdziesiąte (1969-1970 powstały pierwsze komercyjne urządzenia). Od tamtego okresu metoda XPS podlega ciągłym udoskonaleniom, które dają coraz to większy zakres możliwości badawczych i pozwalają na osiąganie różnego rodzaju sukcesów naukowych, a ze względu na jej zalety, technika ta stała się najpopularniejszą spośród wszystkich metod charakteryzujących powierzchnie.

### 3.1. Podstawy fizyczne techniki XPS

Spektroskopia fotoelektronów wzbudzanych promieniami rentgenowskimi (XPS), często nazywana jest również spektroskopią elektronową do analizy chemicznej (ESCA, z ang. *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*), ze względu na podkreślenie jej zastosowań w tej dziedzinie. Jest ona jedną z najczęściej używanych metod badania powierzchniowych warstw ciał stałych, umożliwiającą bezpośredni pomiar elektronowych stanów energetycznych w badanych próbkach [50]. Podstawa tej techniki oparta jest na zjawisku fotoelektrycznym, w którym fotony posiadające dostatecznie dużą energię  $h\nu$ , oddziałując z atomami powierzchni ciała stałego, powodują wybite elektronów z danych poziomów energetycznych. W procesie XPS mierzymy, zatem rozkłady energetyczne elektronów emitowanych z materiału naświetlanego monochromatycznym promieniowaniem rentgenowskim w komorze próżniowej spektrometru, czyli ich energie kinetyczne [54]. Proces ten został zilustrowany na rysunku nr 11.



Rys. 11. Schemat pomiaru metodą XPS [53].

Metoda XPS polega na naświetlaniu próbki miękkim promieniowaniem rentgenowskim, gdzie kwant promieniowania X, padający na atom badanej próbki, podczas zderzenia sprężystego z elektronem przekazuje mu swoją energię  $h\nu$  (Rys. 12). Energia kwantu  $h\nu$ , zgodnie z zasadą zachowania energii, zostaje następnie zużyta na pokonanie energii wiązania  $E_B$  oraz na energię kinetyczną fotoelektronu  $E_K$  [53, 54]. W konsekwencji prowadzi to do emisji fotoelektronu z pasma walencyjnego lub stanów rdzeniowych, jeżeli spełniony jest warunek energetyczny emisji fotoelektronów w postaci [53]:

$$E_B = h\nu - E_K,$$

gdzie:

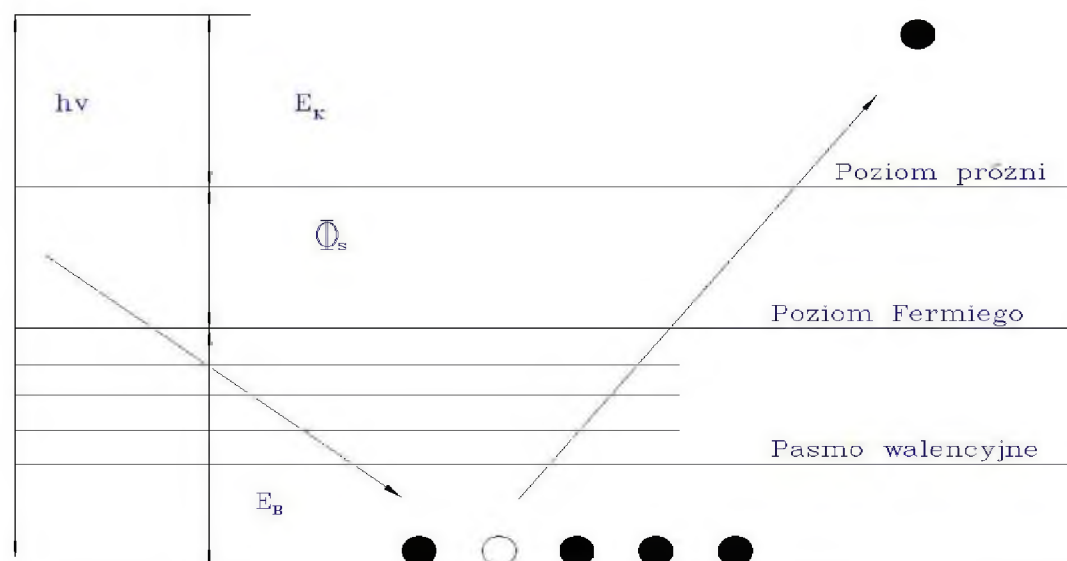
$E_B$  – energia wiązania elektronu w atomie, zależna od rodzaju atomu i jego otoczenia chemicznego;

$h$  – stała Plancka ( $h = 6,62 \cdot 10^{-34}$  Js);

$\nu$  – częstotliwość promieniowania rentgenowskiego;

$E_K$  – energia kinetyczna fotoelektronu.





Rys. 12. Schemat zjawiska fotoelektrycznego [52].

W celu określenia energii wiązania elektronów na poszczególnych powłokach należy zmierzyć energię kinetyczną  $E_K$  wybitych z tych powłok elektronów za pomocą spektrometru. Jednak elektrony opuszczające próbkę muszą pokonać barierę potencjału na jej granicy z próżnią, co związane jest z tzw. pracą wyjścia spektrometru  $\phi_s$ . Praca wyjścia dla próbek zmienia się na skutek ładowania próbki. Dla próbek przewodzących poziomy Fermiego próbki i spektrometru są wyrównane. Musimy znać tylko funkcję pracy wyjścia spektrometru  $\Phi_s$ , aby obliczyć  $E_B$ . Dla próbek nieprzewodzących natomiast zachodzi nagromadzenie ładunku dodatniego na próbce na skutek wybitia elektronów i potencjał próbki przesuwa się w stosunku do poziomu spektrometru [55].

$$E_B = hv - E_K - \Phi_s - E_e$$

$E_e$  – energia ładunku powierzchniowego, stąd zastosowanie neutralizatora oraz kalibracji uzyskanego widma. Neutralizator, czyli działło elektronów małej energii, usuwa powstałe ładunki i zapobiega ładowaniu się próbki, co w konsekwencji prowadziłoby do przesunięć położenia energetycznych linii na widmie.

Rysunek numer 13 przedstawia zmiany pracy wyjścia dla zjawiska fotoelektrycznego oraz dla spektrometru, a także jak zmienia się poziom Fermiego ze względu na pracę wyjścia spektrometru. Ponieważ praca wyjścia spektrometru  $\Phi_s$  dla danego urządzenia stanowi stałą w omawianych równaniach, podobnie znana jest energia promieniowania, to na podstawie pomiarów energii kinetycznej fotoelektronów można bezpośrednio określić energię wiązania elektronów w próbce, jak również pracę wyjścia ciała stałego  $\phi$ :

$$E_K = h\nu - E_B - \phi_s$$

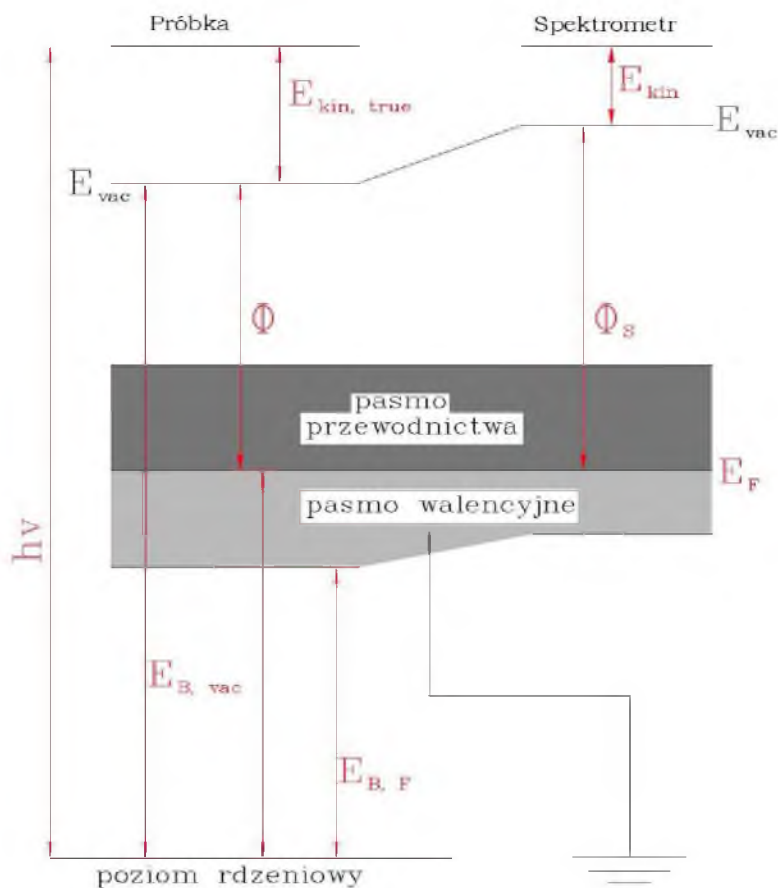
gdzie:

$h\nu$  - energia padającego fotonu,

$E_k$  - energia kinetyczna fotoelektronu wybitego z próbki,

$E_B$  - energia wiązania orbitalu atomowego, z których pochodzi elektron,

$\phi_s$  - praca wyjścia spektrometru [51, 52].



Rys. 13. Zmiana pracy wyjścia na skutek przyłożenia potencjału pomiędzy próbką a spektrometrem [52].

Zjawisko fotoelektryczne obserwuje się również w gazach na oddzielnych atomach i cząsteczkach (fotojonizacja), w jądrach atomowych (reakcje jądrowe) i ośrodkach skondensowanych. Jest ono zjawiskiem kwantowym, a jego odkrycie odegrało fundamentalną rolę w kwantowej teorii światła [55].

Poziom energii wiązania fotoelektronów umożliwia identyfikację pierwiastków, przy czym energia ta zależy od głównej liczby kwantowej  $n$ .

Dla większości pierwiastków ilości rzędu 0.1 udziału atomowego jest już mierzalna. Jedynie elektrony wybijane z pierwszych warstw atomowych w ciele stałym nie są rozpraszane przez elektrony wiążące i niosą niezakłóconą informację. Efektywna grubość warstwy poddanej analizie jest następująca:

- dla próbek organicznych  $(30 - 100) \times 10^{-10} \text{ m}$ ;
- dla próbek nieorganicznych  $(10 - 30) \times 10^{-10} \text{ m}$ ;
- dla metali  $(5 - 20) \times 10^{-10} \text{ m}$  [56].

Jeśli energia fotonu przewyższa energię wiązania elektronu w atomie, to jest prawdopodobne, że elektron ten przejmie przekazaną energię i zostanie wybity ze swojej powłoki natomiast, jeżeli atom, z którego został wyemitowany fotoelektron znajduje się dostatecznie blisko powierzchni tak, aby fotoelektron zmierzający do powierzchni nie uległ nieelastycznym zderzeniom, to elektron ten może opuścić materiał bez strat energii. Taki elektron następnie trafiając do analizatora energii jest rejestrowany w detektorze, tworząc charakterystyczne linie na wykresie I (B.E). Metoda XPS jest, zatem metodą powierzchniową, ponieważ tylko nierozproszone elektrony z cienkiej przypowierzchniowej warstwy dają nam wartościowe informacje [56].

Działanie lampy rentgenowskiej polega na tym, iż elektrony wychodzące z ujemnie naładowanej katody lampy są ogniskowane i przyspieszane dzięki przyłożonemu napięciu między katodą i anodą. Hamowanie elektronów w materiale anody jest źródłem promieniowania ciągłego, natomiast źródłem promieniowania charakterystycznego są przejścia elektronów z wyższych powłok elektronu z danej powłoki przez elektron bombardujący anodę. Nazwy linii promieniowania rentgenowskiego natomiast pochodzą od oznaczenia powłok, w których zapelniane są luki [57].

Rodzaj materiału, z którego zbudowana jest anoda lampy rentgenowskiej determinuje długość fali, a tym samym, energię kwantów promieniowania. Decyduje on o kształcie krzywej rozkładu kwantów i dlatego wyboru materiału należy dokonać z uwzględnieniem dwóch kryteriów. Pierwszym z nich jest szerokość połówkowa piku promieniowania, która musi być na tyle mała, aby nie ograniczała wymaganej rozdzielczości spektrometru ( $<1 \text{ eV}$ ). Drugim z kryteriów jest energia kwantów promieniowania X, która musi być na tyle duża, aby kwanty te docierały do najgłębiej położonych orbitali atomów badanego materiału i powodowały emisję znajdujących się tam elektronów. Pierwsze kryterium szerokości piku spełniają tylko magnez, glin i krzem, przy czym istnieją technologiczne ograniczenia związane z wytworzeniem anody krzemowej [53]. Dlatego też, w badaniach XPS, jako źródło promieniowania stosuje się standardowej budowy lampy rentgenowskie z anodą magnezową

(Mg) i aluminium (Al), gdzie napięcie przyspieszające elektrony wynosi około 15 kV. W promieniowaniu takiej lampy największe natężenie ma nierozdzielny o najsilniejszym promieniowaniu dublet  $K_{\alpha 1,2}$ . Oprócz niego występuje również promieniowanie  $K_{\beta}$  i inne linie charakterystyczne oraz promieniowanie hamowania. Niezbędna jest tutaj, zatem monochromatyzacja promieniowania padającego na próbkę, co możliwe jest przy użyciu monochromatora kwarcowego [57].

Zamiast długości fali podaje się energię kwantów promieniowania  $h\nu$  otrzymywane przy użyciu tych lamp, a wynoszą one odpowiednio [53]:

$$\text{Mg } E(K_{\alpha 1,2}) = 1253,6 \text{ eV}$$

$$\text{Al } E(K_{\alpha 1,2}) = 1486,6 \text{ eV}$$

Liczba wybitych fotoelektronów zależy od natężenia promieniowania, zaś z częstotliwością związana jest ich energia kinetyczna. Dzięki analizie energii kinetycznej fotoelektronów jesteśmy w stanie zidentyfikować pierwiastki i zanalizować ich wiązania, natomiast natężenie fotoelektronów pozwala na określenie koncentracji pierwiastków oraz analizę obecności różnych wiązań.

### 3.2. Opis procesu fotoemisji

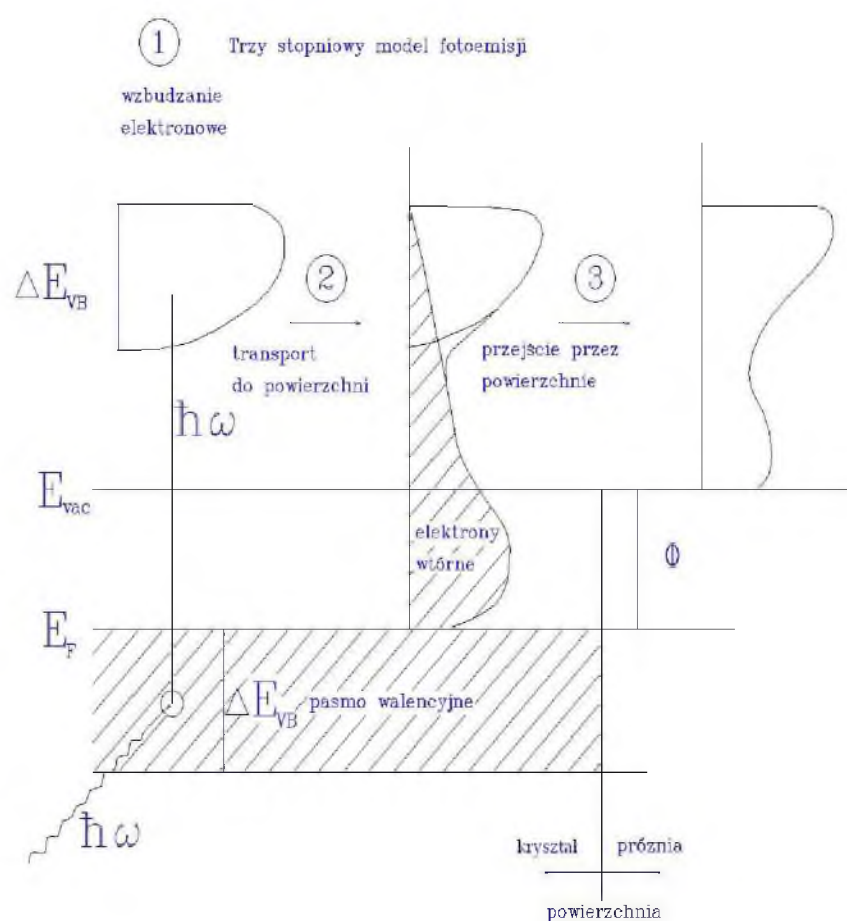
Ścisłe teoretyczny opis fotoemisji wymaga pełnego kwantowo-mechanicznego podejścia do procesu, w którym elektron jest usuwany z zajmowanego stanu w ciele stałym, a następnie zarejestrowany. Opisując ten proces korzysta się z dwóch modeli: pierwszy to model jednostopniowy (*one step model*), w którym rozważa się absorpcję fotonu pod wpływem kwantu promieniowania  $h\nu$  i towarzyszącą temu emisję elektronu, dającą linię fotoemisyjną. Drugi model zwany trójstopniowym (*three step model*), też jest modelem uproszczonym, nieuwzględniającym wpływu pozostałych elektronów na proces fotoemisji [58].

W tym modelu proces fotoemisji jest podzielony na trzy obszary i na trzy niezależne procesy:

- lokalną absorpcję fotonu i wzbudzenie elektronu do stanu niezwiązanego (fotojonizację);
- transport elektronu przez próbkę do jej powierzchni;

- przenikanie fotoelektronu przez powierzchnię i emisję do próżni, gdzie zostaje on zarejestrowany [58].

W pierwszym etapie następuje absorpcja fotonu o energii  $h\nu$  i wzbudzenie elektronu do wolnego stanu dozwolonego regułami wyboru. W czasie przejścia do powierzchni materiału elektron może podlegać zderzeniom z innymi elektronami lub powodować wzbudzenia plazmonów [50]. Elektrony, które straciły częściowo swoją energię, są przyczyną powstania tła. Ciągłe tło w widmie XPS jest spowodowane przez takie elektrony, które nie dają żadnych informacji o ich początkowych stanach. W skład tła wchodzi także elektrony wtórne.



Rys. 14. Trójstopniowy model fotoemisji elektronów.

Najlepszą drogą do uzyskania wiązki promieniowania o ściśle określonej energii jest zastosowanie monochromatora. W spektroskopii XPS najczęściej, jako monochromator wykorzystywany jest układ Rowlanda, składający się z kryształu kwarcu o promieniu krzywizny  $2R$ , umieszczonego wraz z próbką oraz źródłem promieniowania  $h\nu$  na okręgu o promieniu  $R$ . Monochromator można zaliczyć do urządzeń pomocniczych, które zapewnia

jednorodność promieniowaniu X padającemu na próbkę. Promieniowanie odbite od powierzchni kryształu będzie ogniskować się na próbce tylko wtedy, kiedy źródło promieniowania oraz próbka zostaną umieszczone na okręgu w taki sposób, aby ich kierunki w stosunku do powierzchni kryształu utworzyły kąt  $\theta$ , zgodnie z prawem Bragga  $n\lambda = 2d \sin\theta$  ( $\lambda$  – długość fali promieniowania;  $d$  – stała sieci). Taka monochromatyzacja poprawia zdolność rozdzielczą i pozwala pozbyć się promieniowania hamowania [53].

### 3.2.1. Widma fotoelektronów XPS

Dla wielu badań przy użyciu techniki XPS najważniejsze jest określenie względnych koncentracji pierwiastków wchodzących w skład badanej próbki (analiza jakościowa i ilościowa pierwiastków). Wyniki takich pomiarów przedstawia się w postaci wykresów zależności liczby zliczeń elektronów w danym przedziale energii od energii wiązania elektronów (widma, spektrum XPS). Widmo powstałe w wyniku stosowania tejże aparatury ma postać wąskich linii spektralnych (zwane popularnie pikami), odwzorowujących energię wiązania pierwiastków na poszczególnych powłokach elektronowych danej próbki. Ponieważ budowa atomu każdego pierwiastka jest niepowtarzalna, to pomiar energii wiązania pozwala na identyfikację w próbce atomów różnych pierwiastków i atomów tych samych pierwiastków, znajdujących się w różnych stanach chemicznych [53]. Otrzymany pik z pomiarów może być również superpozycją różnych pików.

W większości przypadków, używając metody XPS, na początku przeprowadza się wstępny pomiar w całym możliwym zakresie energii, ale ze stosunkowo dużym krokiem (np. 0.5 eV). Uzyskane w ten sposób widmo nazywane jest widmem zbiorczym (*survey scan*). Pomiar ten ma duże znaczenie, pomimo jego względnie mniejszej rozdzielczości, ponieważ pozwala na odróżnienie linii fotoelektronów od linii Augera, wstępne rozpoznanie pierwiastków z badanej warstwy, wyznaczenie granic energetycznych dla pomiarów szczegółowych oraz rozpoznanie linii satelickich, a także określenie stopnia zanieczyszczenia powierzchni przez obecność obcych atomów. W dalszej kolejności wykonuje się pomiary widm szczegółowych (*detail scans*). Pomiary te zaczyna się od kalibracji widma fotoelektronów, badając linie węgla kontaminacyjnego C1s (284.6 eV lub 285.0 eV) lub używając linii innego pierwiastka, którego energię dobrze znamy. W przypadku polimerów wszystkie przesunięcia chemiczne linii w widmie XPS mierzy się względem linii naturalnego węgla C-H/C-C znajdującego się przy energii wiązania równej 285.0 eV. Pomiary te przeprowadza się na wybranych obszarach i stosuje możliwie dużą rozdzielczość

(np.: 0.1 lub 0.05 eV). Elektrony, które natomiast doznały rozproszeń wchodzi w skład tła. Również fotoemisja spowodowana widmem ciągłym lampy rentgenowskiej (nie monochromatyzowanej) powoduje jego wzrost, zwłaszcza w zakresie niskiej energii kinetycznej, czyli wysokiej energii wiązania [59].

W widmie XPS można zaobserwować kilka rodzajów linii fotoemisyjnych, opisane są one w katalogach widm oraz bazach danych [60]. Wszystkie linie możemy podzielić na: linie rdzeniowe, linie pasma walencyjnego, linie Auger'a, satelity promieniowania rentgenowskiego oraz linie satelitarne XPS. Ponadto wiele linii ma postać rozszczepionego dubletu lub multipletu [58]. Taka struktura może być wynikiem różnych mechanizmów rozszczepienia, jak na przykład: rozszczepienie spin-orbita, które opisane jest szczegółowiej w podrozdziale 3.3.1.

Dzięki analizie takich własności jak wysokość, szerokość połówkowa, pole powierzchni, kształt, czy też wzajemne proporcje i zależności linii fotoemisyjnych, jesteśmy w stanie m.in. zidentyfikować pierwiastki, obliczyć ich koncentrację, czy otrzymać informacje na temat stanu chemicznego badanego materiału.

### 3.3. Analiza widm XPS

Spektroskopia fotoelektronów XPS jest metodą pozwalającą na bezpośrednie określenie z widm fotoemisyjnych energii wiązania  $E_B$  elektronów na wszystkich poziomach energetycznych w atomie, od poziomu  $K$  do poziomu Fermiego. Energię wiązania dla poszczególnych poziomów energetycznych prawie wszystkich pierwiastków zostały zmierzone po raz pierwszy przez Siegbahna i opublikowane w formie tablic, w wielu pracach m.in. *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy, Physical Electronics* [60]. Takie precyzyjne określenie energii wiązania elektronów stwarza szerokie możliwości zastosowań w zakresie badań własności fizycznych materii [57]. Widma te zawierają, bowiem wszystkie niezbędne informacje na temat badanej powierzchni: o jej składzie, strukturze, budowie elektronowej i dynamice. Duża czułość tej metody pozwala również na jej zastosowanie do analizy składu pierwiastków występujących w próbce, nawet w bardzo małym stężeniu [53].

Metoda ta jest uniwersalna, gdyż pozwala na rozróżnianie atomów, które znajdują się w różnych stanach walencyjnych, a dzięki temu możliwa jest identyfikacja pierwiastków tworzących dany związek chemiczny [53]. Należy jednak pamiętać, że otrzymany wynik jest właściwy dla warstwy przypowierzchniowej i nie zawsze będzie zgodny ze składem chemicznym materiału w jego objętości. Rejestruje się, bowiem tylko te elektrony, które

wychodzą z preparatu z głębokości kilkunastu nm. Rejestracji ulegają także elektrony pochodzące z gazów zaadsorbowanych na powierzchni, jak na przykład  $\text{OH}^-$  i  $\text{CO}_2$ .

Wyniki pomiarów metodą XPS mają postać wąskich pików odpowiadających liniom serii K, L, M pierwiastków. Intensywność linii odpowiadających różnym elektronom zależy od przekrojów czynnych oraz pewnych parametrów charakterystycznych dla spektrometru. Wyliczenie koncentracji atomowej jest dokonywane automatycznie po wybraniu odpowiednich linii i odcięciu tła.

### Poziomy rdzeniowe

Fotoelektrony wybite z konkretnych poziomów rdzeniowych dają wkład do najbardziej intensywnych i zazwyczaj najwyższych linii w widmach XPS, a ponieważ pozycje tych linii są charakterystyczne dla każdego pierwiastka, dzięki temu możemy je zidentyfikować.

Szerokość linii stanu rdzeniowego jest splotem własnej szerokości linii i zależy od kilku czynników zarówno o charakterze naturalnym, jak i instrumentalnym, tj.: czasu życia dziury utworzonej podczas procesu fotoemisji, nierozdzielnych, chemicznie przesuniętych pików, multipletowych stanów, rentgenowskiej szerokości linii, czy skończonej rozdzielczości analizatora przyrządu pomiarowego. Wielkością najlepiej charakteryzującą szerokość linii jest jej szerokość połówkowa, czyli szerokość linii fotoemisyjnej zmierzona w połowie jej wysokości (FWHM – *full width at half maximum*):

$$\gamma = \sqrt{\gamma_n^2 + \gamma_p^2 + \gamma_a^2},$$

gdzie:  $\gamma_n$  - reprezentuje naturalną szerokość linii rdzeniowej,

$\gamma_p$  - szerokość linii rentgenowskiej,

$\gamma_a$  - rozdzielczość analizatora.

Symetryczny kształt linii określony własnościami sprzętowymi (rozmycie wiązki padającej rzędu 1 meV – 1 eV oraz rozmycie wiązki analizowanej rzędu 1 meV – 100 meV) opisany jest funkcją Gaussa:

$$f_G(\varepsilon) = \exp\left(-\ln 2 \frac{4\varepsilon^2}{\gamma_i^2}\right),$$

gdzie:  $\gamma_i^2 = \gamma_p^2 + \gamma_a^2$  opisuje szerokość połówkową linii,

$\varepsilon = E - E_{\max}$  ( $E_{\max}$  – energia maksimum intensywności linii).



Kształt linii z czasem życia fotodziury opisuje funkcja Lorentza:

$$f_L(\epsilon) = \left(1 + \frac{4\epsilon^2}{\gamma^2}\right)^{-1},$$

Całkowita linia fotoemisyjna jest, zatem kombinacją złożenia funkcji Gaussa i Lorentza, gdzie krzywa Gaussa opisuje część pochodzącą od niepewności wynikającej z ograniczeń aparaturowych:

$$f(\epsilon) = f_L \otimes f_G = \int_{-\infty}^{+\infty} f_L(\epsilon') f_G(\epsilon - \epsilon') d\epsilon'$$

Linie satelitarne XPS powstają w wyniku wybicia elektronu z powłoki atomu, co prowadzi do wzbudzenia pozostałego układu. Wzbudzenie tego typu wymaga dostarczenia pewnej porcji energii. Gdy taka energia zostanie dostarczona elektron może przeskoczyć z niższej orbity na wyższą, przechodząc w stan wzbudzony. W tym przypadku energia kinetyczna emitowanego elektronu jest zredukowana o pewną wartość odpowiadającą różnicy energii pomiędzy stanem podstawowym, a stanem wzbudzonym. W efekcie, w widmie fotoemisyjnym możemy obserwować dodatkowe piki po stronie wyższej energii wiązania w stosunku do linii głównej, określane są one mianem satelitów shake – up [60].

### Pasmo walencyjne

Stany rdzeniowe zwykle dające ostre, dobrze rozdzielone linie o małej intensywności, występują w obszarach niskich energii wiązania, pomiędzy poziomem Fermiego i wartością ok. 30 eV, wchodząc w skład pasma walencyjnego. W zdelokalizowanych lub związanych orbitalach mają one małą energię wiązania, a ich widma mają charakter pasmowy, tzn. mają dużo blisko położonych poziomów, a z powodu małego przekroju czynnego na fotoemisję, linie walencyjne w porównaniu z rdzeniowymi, mają mniejsze natężenie. Analizując pasma walencyjne można uzyskać informacje o potencjalnych wkładach do całkowitej gęstości stanów poszczególnych składników układu, jak również określić charakter przewodnictwa badanego materiału, czy oszacować wielkość przerwy energetycznej [61].

#### 3.3.1. Przesunięcie chemiczne

Początkowy stan energetyczny atomu zależy m. in. od rodzaju atomów tworzących związek chemiczny oraz od wiązań, jakie dany atom tworzy z atomami sąsiednimi, a więc

jego otoczeniem chemicznym. Wszelkie różnice stanu energetycznego atomu związane z powstawaniem tych wiązań skutkują zmianami energii wiązania jego elektronów. Poznając dalej energię wiązania elektronów na poszczególnych orbitalach, możemy wnioskować o naturze wiązań chemicznych w cząsteczce. Ponieważ każda z powłok ma inną energię wiązania, a każdy z atomów ma charakterystyczny dla siebie układ poziomów energetycznych, analiza widma XPS umożliwia określenie składu pierwiastkowego próbki.

Energia wiązania poziomów rdzenia dla nierównoważonych atomów, czyli o różnych stanach utlenienia, w różnym otoczeniu chemicznym i mających różne pozycje sieciowe, jest inna. Taką zmianę rozkładu ładunku w powłoce walencyjnej, wpływającą na wszystkie wewnętrzne elektrony, która przejawia się w widmach zmianą energii wiązania nazywamy przesunięciem chemicznym (ang. *chemical shift*) [53]. Może ona być traktowana, jako wynik zmiany w przestrzennie uśrednionym kolumbowskiemu i wymiennemu potencjale wywieranym na elektron przez jego otoczenie.

Z definicji, przesunięcie chemiczne wewnętrznego orbitalu elektronowego danego atomu określa różnicę energii tego orbitalu w danym związku chemicznym i w prostej cząsteczce (substancja odniesienia) [55, 61]:

$$\Delta E_B = E_B - E'_B,$$

gdzie:

$\Delta E_B$  – przesunięcie chemiczne,

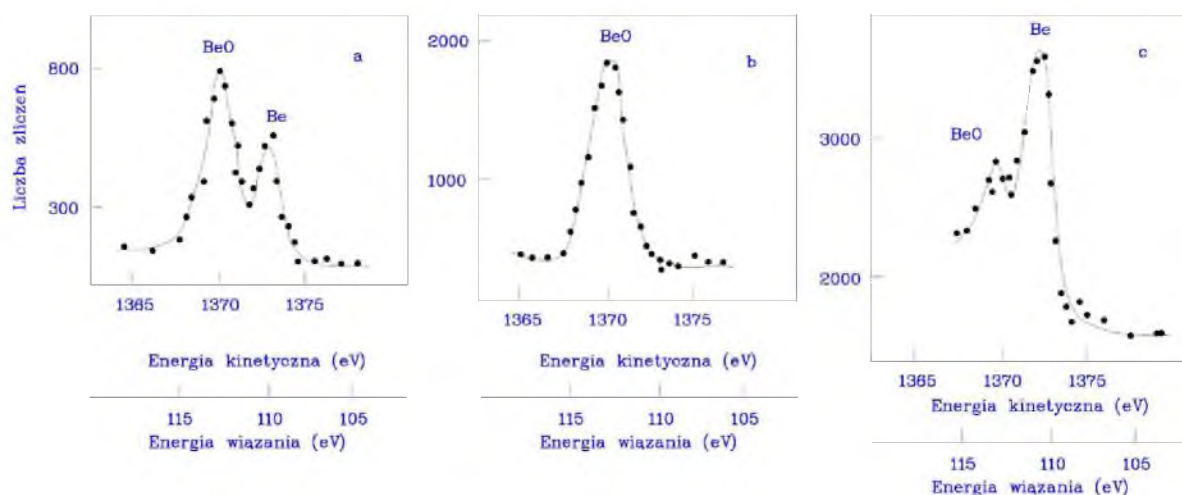
$E_B$  – energia wewnętrzna orbitalu w danym związku chemicznym,

$E'_B$  – energia tego orbitalu w prostej cząsteczce.

Przesunięcie chemiczne jest źródłem informacji o wartościowości pierwiastka, liczbie koordynacyjnej, a także umożliwia identyfikację związków chemicznych, w jakich znajduje się dany atom. Pozwala również na obserwację stanu utlenienia atomu i na ogół zwiększa się ono wraz z powiększaniem się stopnia utlenienia atomu. Na podstawie specjalnie opracowanych katalogów w szybki sposób można dowiedzieć się, jakie są wartości energii wiązania i przesunięć chemicznych dla pierwiastków występujących w różnych związkach chemicznych [55]. Ważnym zastosowaniem analizy stanów rdzeniowych są badania własności strukturalnych przy pomocy przesunięć chemicznych. Spektroskopia poziomów rdzenia może być także stosowana do obserwacji i badań przejść fazowych.

Przesunięcia chemiczne w widmie XPS stwarzają charakterystyczne układy położenia pasm atomów tego samego pierwiastka w różnych konfiguracjach strukturalnych, co sprawia jednak duże problemy w interpretacji występujących wiązań chemicznych. Dla przykładu,

zjawisko takie zostało zaobserwowane dla metalicznego berylu naparowanego pod ciśnieniem  $10^{-7}$  Pa na aluminiowy podkład (Rys. 15) [53]. Rejestrowano linie wybijane z powłoki Be1s. Otrzymane widmo składało się z dwóch linii o porównywalnych natężeniach, oddległych od siebie o około 2.9 eV. Występowanie tych dwóch linii wytłumaczono tym, iż beryl był częściowo utleniony i jedna z linii odpowiadała metalicznemu Be, a druga tlenkowi Be. Dla potwierdzenia tego wniosku próbkę wygrzano w powietrzu do całkowitego utlenienia pierwiastka. Po tym procesie na widmie fotoemisyjnym pojawiła się tylko jedna linia odpowiadająca BeO. Następnie metaliczny beryl został naparowany w próżni i częściowo odtleniony cyrkonem. Taki zabieg przyniósł znaczny spadek natężenia linii odpowiadającej tlenkowi berylu. Oznacza to, że przy utlenianiu energia wiązania elektronu 1s berylu wzrasta o 2.9 eV.



Rys. 15. Widma elektronów Be1s: (a) linia metalicznego Be otrzymanego przez naparowanie w próżni; (b) linia Be po wygrzaniu w powietrzu; (c) linia Be po naparowaniu w próżni i częściowym odtlenieniu cyrkonem [53].

Przesunięcia chemiczne mogą być skorelowane z konfiguracją energetyczną elektronów walencyjnych, co jest podstawą do zrozumienia własności fizycznych i chemicznych substancji, ponieważ elektrony walencyjne determinują te własności. Spektroskopia fotoelektronów jest, więc źródłem informacji o rozkładzie ładunku spowodowanym oddziaływaniem chemicznym [53].

## Rozszczepienie spin – orbita

Każdy elektron posiada własny spin, który determinuje spinowy moment pędu. Pozostają one w ciągłym ruchu, a ponieważ są obdarzone ładunkiem ujemnym, to posiadają moment magnetyczny związany ze spinem. Ponadto, każdy elektron posiada orbitalny moment pędu, zachowujący się jak obwód prądowy i związany z nim moment magnetyczny. Wzajemne oddziaływanie momentów pędu spinowego i orbitalnego nazywane jest sprzężeniem spinowo-orbitalnym. Wielkość takiego sprzężenia zależna jest od wzajemnej orientacji obu momentów magnetycznych. Orientacja tychże momentów, uzależniona jest wyłącznie od całkowitego momentu pędu elektronów, wyrażonego poprzez wektorową sumę orbitalnego i spinowego momentu pędu. Kiedy są one skierowane przeciwnie, całkowity moment ma niską wartość natomiast, gdy są niemal równoległe – wysoką [60].

Zwykle linie spektralne związane z poziomami rdzeniowymi, które pochodzą od elektronów typu *s* stanowią pojedyncze linie. Natomiast pozostałe, czyli z podpowłok typu *p*, *d*, oraz *f* są dubletami (inaczej: linie podwójne). Jest to efekt rozszczepienia tych poziomów w atomach (*spin-orbit splitting*) w czasie jonizacji, co z kolei jest pochodną sprzężenia orbitalnych i spinowych momentów pędu elektronów. Takie linie składają się z dwóch pików położonych w określonej od siebie odległości, zależnej od rodzaju pierwiastka i rodzaju podpowłoki oraz w ściśle określonym stosunku intensywności. Stosunek ten zależy od degeneracji kwantowej tych linii (linia *p* to 1:2, linia *d* to 2:3, linia *f* to 3:4, należy tu zaznaczyć, że linie o mniejszej energii wiązania są wyższe). Odległość pomiędzy liniami w danym dublecie to rząd od ułamka do kilkunastu, bądź więcej elektronowoltów [61].

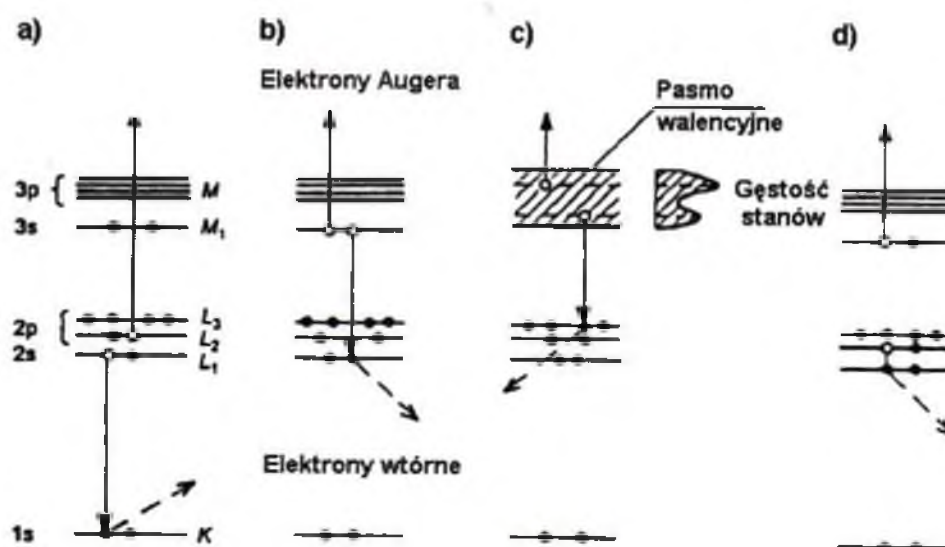
Dubletowy charakter linii jest przede wszystkim wynikiem oddziaływania magnetycznego między orbitalnym momentem magnetycznym i wewnętrznym momentem pędu elektronu. W sprzężeniu  $j-j$ , całkowity moment pędu jednego elektronu  $j$  jest dany jako suma spinowego orbitalnego momentu ( $j = l \pm s$ ). Aby otrzymać całkowity moment atomu  $J$ , trzeba zsumować całkowite momenty składowych elektronów  $J = \sum j$ . Dlatego, z wyjątkiem przypadku  $l = 0$  (poziom *s*), dla każdego stanu  $nl$  występuje podwójna linia w widmie XPS:  $nl_{l+1/2}$  i  $nl_{l-1/2}$ , których względne natężenia są dane następująco:

$$\frac{I_{l-s}}{I_{l+s}} = \frac{2(l-1/2)+1}{2(l+1/2)+1} = \frac{l}{l+1}$$

Dla przykładu, dla  $l = 1$  (poziomy *p*), względne natężenia odpowiadającego dubletu,  $p_{3/2}$  i  $p_{1/2}$  są w stosunku 2:1, podczas gdy dla  $l = 2$  (poziomy *d*) wynoszą 3:2 [61].

## Linia Auger'a

Foton promieniowania rentgenowskiego może wybić elektron z najgłębszej powłoki K lub L (o głównej liczbie kwantowej 1 lub 2). W procesie zwanym relaksacją powstałą lukę elektronową w powłoce K zajmuje dowolny elektron z wyższej powłoki L, oddając porcję energii w postaci wtórnego fotonu. Różnica energetyczna może być wypromieniowana w postaci kwantu  $h\nu$  lub też przekazana innemu elektronowi zajmującemu poziom w powłoce L. Taki elektron zostaje wtedy wyemitowany z atomu (elektron Auger'a), co prowadzi do stanu z dwoma nieobsadzonymi poziomami zlokalizowanymi w dolnej powłoce. W opisanym przypadku schematowi przedstawionemu na rys. 16 a) odpowiadają symbole KLL. To zjawisko zostało odkryte w roku 1923 przez Pierra Auger'a i wykorzystywane jest w spektroskopii fotoelektronów Auger'a (ang. *Auger Electron Spectroscopy*) – AES [62].



Rys. 16. Schemat przejść Auger'a : (a)  $KL_1L_2$ , (b)  $L_1M_1M_1$ , (c)  $L_3VV$ , (d) przejście Costera – Kroninga  $L_1L_2M_1$  [62].

Na rys. 16 b) elektron padający wybija elektron wtórny z powłoki  $L_1$ , a powstała po nim dziura zostaje obsadzona przez elektron z powłoki  $M_1$ . Nadwyżka energetyczna jest przekazana innemu elektronowi zajmującemu także poziom  $M_1$ , który zostaje wyemitowany w postaci elektronu Auger'a. Proces ten oznacza się zwykle symbolami  $L_1M_1M_1$ . Przejścia Auger'a mogą zachodzić również w paśmie walencyjnym. Tego rodzaju procesy opisane są jako WVV. Na rys. 16 c) przedstawione jest przejście typu  $L_3VV$ , gdzie pierwotna dziura zostaje utworzona w tym przykładzie na poziomie  $L_3$ . Dziurę tę zapełnia elektron z pasma

walencyjnego V, a powstała różnica energii przekazana jest innemu elektronowi z tego samego pasma, który zostaje wyemitowany w postaci elektronu Auger'a.

Oprócz przejścia Auger'a mogą zachodzić także przejścia bezpromienne, np.: Costera-Kroninga. Są to przejścia typu LLM (Rys. 16 d). Jeżeli są one tylko dozwolone, to zachodzą z większym prawdopodobieństwem niż przejścia Auger'a, co wynika z silniejszego oddziaływania bliżej położonych stanów.

Energia kinetyczna wyemitowanego elektronu Auger'a dana jest dla przejścia  $KL_1L_2$  przez:

$$E_{\text{kin}} = E_K - E_{L1} - E_{L2}$$

i określana jest przez wartość energii poziomów biorących udział w przejściu. Poszczególne składowe energii z powyższego wzoru mogą być wyznaczone eksperymentalnie z metody XPS.

## Tło

W czasie drogi do powierzchni fotoelektrony wybite z konkretnych poziomów elektronowych ulegają rozpraszaniu w wyniku zderzeń z innymi elektronami. W taki sposób tracą część energii, co w efekcie daje widoczne na widmie fotoemisyjnym tło. Opis tła został po raz pierwszy zaproponowany przez Shirley'a, jednakże model ten w wielu przypadkach nie jest wystarczający, dlatego często stosuje się opis tła korzystając z modelu Tougaard'a [58].

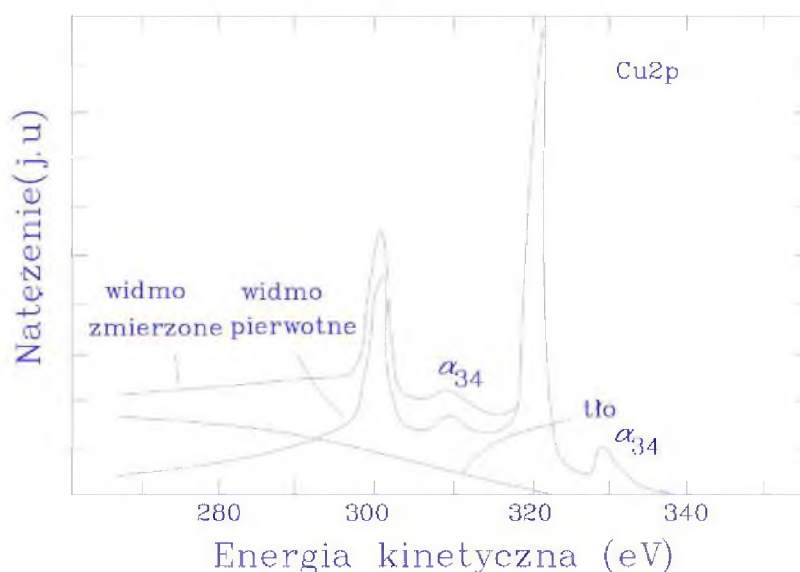
Widmo XPS składa się zawsze z linii fotoemisyjnych, czyli tzw. widma pierwotnego oraz tła. Aby opracować widmo należy to tło odjąć. Jest to niezwykle ważny etap analizy, ponieważ ma bardzo istotny wpływ na otrzymywane wyniki. Istnieje wiele metod tego procesu, jednak do najpowszechniejszych należą:

- Metoda liniowa;
- Metoda Shirley'a;
- Metoda Tougaard'a;
- Metoda EELS.

Najprostszą metodą jest metoda liniowa. Wystarczy poprowadzić prostą linię pomiędzy dwoma wybranymi punktami u podstawy linii (piku) fotoelektronów i wtedy powierzchnie pod linią traktuje się, jako tło. Jest ona bardzo szybką metodą jednak wprowadza największe błędy. Metody Shirley'a i Tougaard'a są bardziej skomplikowane.

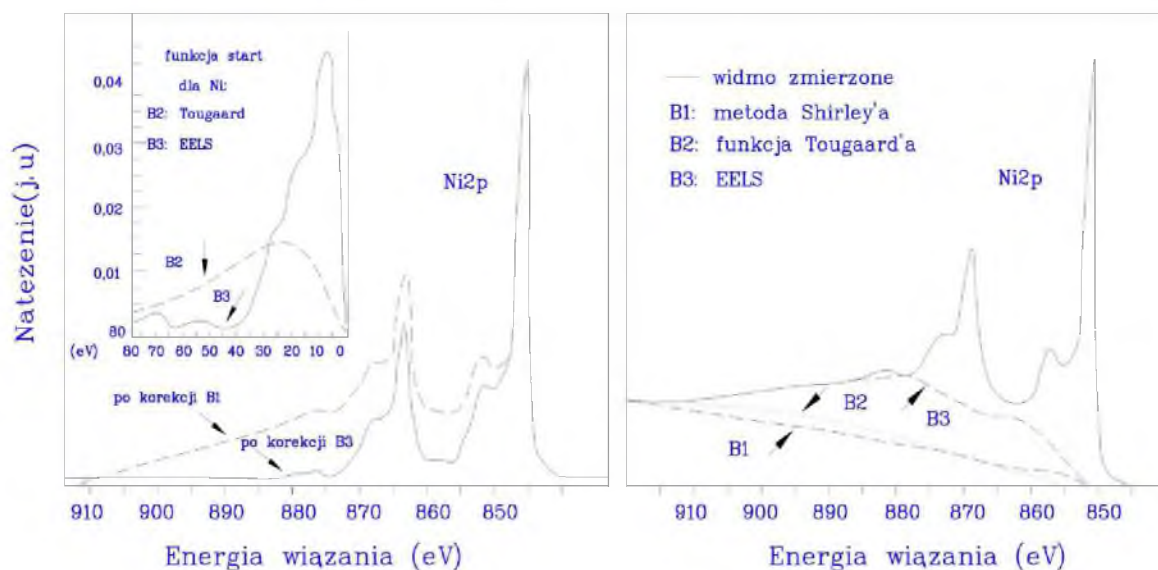
W metodzie Shirley' a linie tła tworzy się zakładając, że elektron działa, jako źródło dla rozproszonych elektronów o niższej energii kinetycznej, a zatem jest proporcjonalne do ogólnej ilości fotoelektronów o wyższej energii kinetycznej. Metoda Tougaar' da zakłada natomiast, że wkład tła do widma od stanów elektronowych próbki maleje eksponentalnie wraz z rosnącą energią kinetyczną fotoelektronów (lub malejącą energią wiązania) [61, 63].

Prostą procedurą analizy tła w procesie fotoemisji jest również uzyskanie funkcji strat  $\lambda_{tot}(E)\lambda^{-1}(E-E')$  z eksperymentu EELS (*Electron Energy Loss Spectroscopy*). W metodzie tej próbkę bombarduje się elektronami o żądanej energii i rejestruje się wybite elektrony. Część elektronów ulega odbiciu bez strat energii, a inna część rozproszeniu. Linie w widmie EELS będą pochodzić od plazmonów lub wzbudzeń z konkretnych poziomów energetycznych. Budując funkcje strat obcina się pik elastyczny, a na bazie reszty tworzy się funkcje w zależności od energii wzbudzenia pierwotnego. Funkcja strat będzie charakterystyczna dla konkretnej linii. Sumując funkcje pochodzące od wszystkich linii otrzymuje się tło [58].



Rys. 17. Analiza linii Cu2p dla metalicznego Cu z uwzględnieniem tła [58].

Dla linii Ni2p tło zostało dopasowane trzema sposobami: Shirleya, Tougaarda oraz za pomocą funkcji strat z metody EELS (Rys. 18). Pierwsze dwa dopasowania dają podobne wyniki, podczas gdy funkcja strat daje znaczne różnice, dlatego też do określania linii tła stosuje się przeważnie funkcje Shirley' a  $S(E)$  lub Tougaard' a  $T(E)$ .



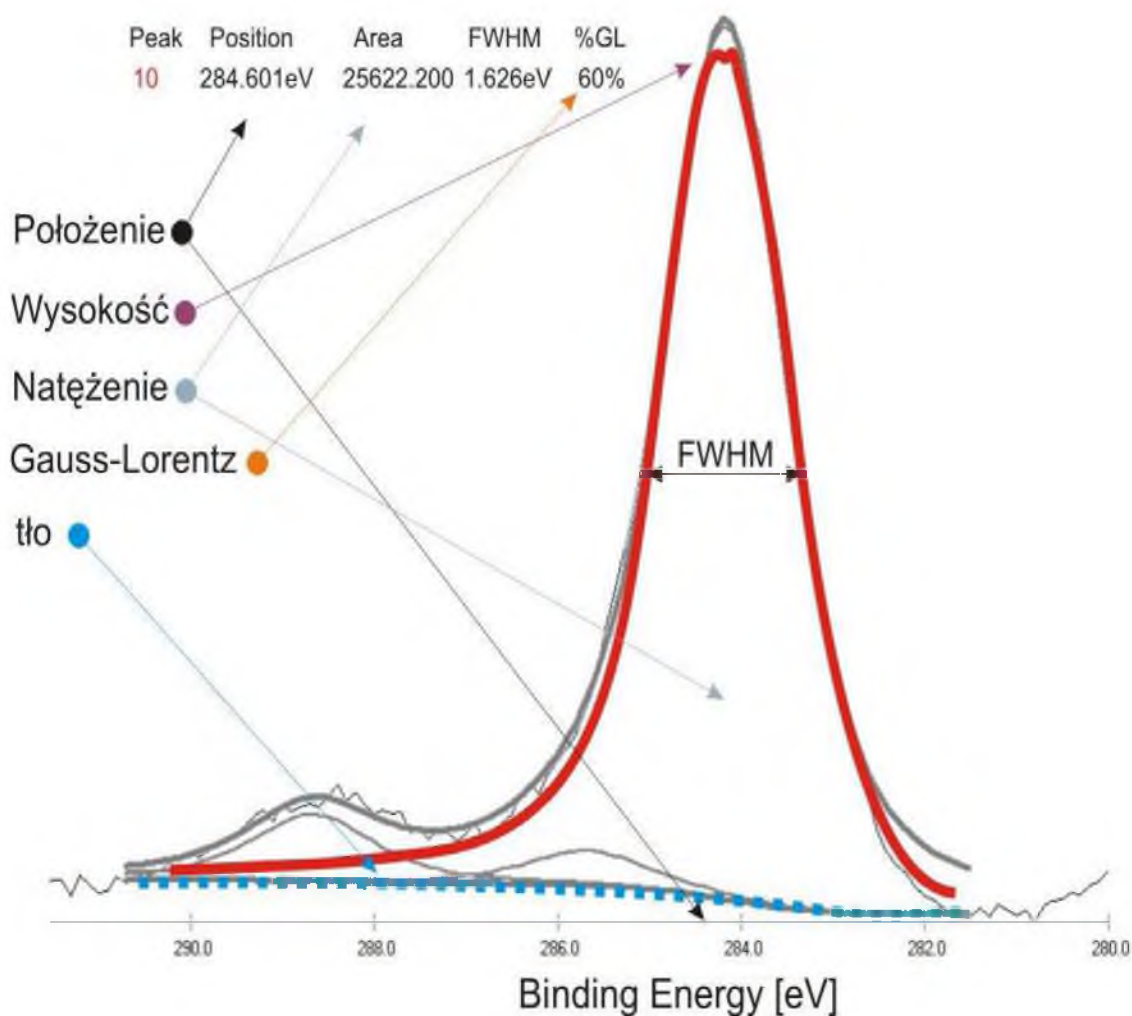
Rys. 18. Różne metody odejmowania tła dla linii Ni2p [58].

### 3.3.2. Program *Multipak*

Za pomocą standardowego oprogramowania producenta *Multipak Physical Electronics* możliwa jest analiza ilościowa i jakościowa widm XPS. Na początku odejmowane jest tło, zwykle metodą Shirley'a lub Tougaard'a, dalej liczona jest powierzchnia linii, które są wyraźnie widoczne w widmie. Ograniczenie obszaru poszczególnych linii danego pierwiastka zostaje indywidualnie wybrane i następuje całkowanie powierzchni piku [58]. Program ten wykorzystuje przede wszystkim powierzchnię pod linią i czynnik jej czułości. Obliczenie standardowej koncentracji atomowej jest stosunkiem każdego udziału danego pierwiastka do sumy udziałów pozostałych pierwiastków w spektrum. Rozważane są zawsze tylko te pierwiastki, dla których określona linia jest wyraźnie widoczna w widmie. Dokładność tej metody jest mniejsza niż  $\pm 10\%$ .

Do głównych cech charakteryzujących każdy pik zaliczamy: FWHM, czyli jego szerokość połówkową, mierzoną w połowie wysokości, położenie, wysokość, szerokość, natężenie (pole powierzchni pod linią) oraz stosunek Gauss-Lorentz (Rys. 19).





Rys. 19. Przykładowy pik i jego główne cechy [64].

Linie w widmach XPS mają generalnie kształt lorenzowski z pewnym gaussowskim charakterem, dlatego wynik lorenzowski – gaussowskiej funkcji z różnymi mieszanymi parametrami jest poprawnym dopasowaniem linii XPS [59]. Dopasowanie widm przy użyciu funkcji Gaussa – Lorentza i odcięcie tła metodą Tougaard’a dokonuje się w dalszej części opracowywania widm przy pomocy programu Simpeak.

### 3.3.3. Analiza ilościowa

Prócz analizy jakościowej metoda XPS pozwala na wykonanie dokładnej analizy ilościowej. Metody stosowane w ilościowych pomiarach XPS uwzględniają czynniki czułości powierzchni lub wysokości pików. Dzięki temu możemy wyznaczyć procentowy skład

atomowy powierzchni próbki, mierząc natężenia poszczególnych linii, których miarą są pola powierzchni pod „pikami”, odpowiadające energii badanych fotoelektronów:

$$I = f \sigma k p \lambda a T S N,$$

gdzie:

$f$  – natężenie strumienia promieni X;

$\sigma$  – przekrój czynny jonizacji badanego pierwiastka;

$k$  – współczynnik zależny od usytuowania próbki, źródła promieniowania X i analizatora;

$p$  – współczynnik sprawności procesu emisji fotoelektronów o badanej energii;

$\lambda a$  – średnia droga rozproszenia elektronów;

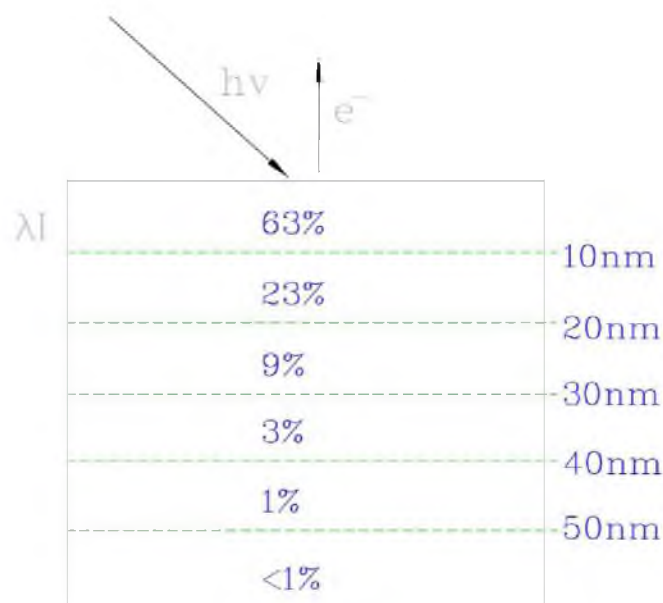
$T$  – wydajność detektora fotoelektronów;

$S$  – pole powierzchni badanej próbki;

$N$  – liczba atomów, zawartych w jednostce objętości badanej próbki, będących źródłem fotoelektronów.

Znajomość natężenia poszczególnych fotolinii oraz współczynnika transmisji soczewek elektrostatycznych, a także analizatora hemisferycznego przyczynia się do wykonania analizy ilościowej. Metoda XPS pozwala na wykrywanie atomów o liczbie atomowej  $Z > 2$  w ilości od 0,1% monowarstwy atomowej. Informacja o składzie powierzchni i jej strukturze elektronowej pochodzi z warstwy powierzchniowej o grubości ściśle związanej z drogą swobodną elektronów. Definiuje się ją, jako średnią drogę, jaką przebywa elektron pomiędzy zderzeniami nie sprężystymi. Zależy przede wszystkim od energii kinetycznej fotoelektronu i rodzaju materiału. Przyjmuje ona jednak dla wszystkich typów materiałów dla metody XPS, tj. od ok. 100 do 1400 eV, wartości rzędu kilku nanometrów [63].

Jako przykład, na rysunku numer 20 pokazano wkład poszczególnych rejonów próbki do całkowitego natężenia sygnału w widmie fotoelektronowym (przyjęto, że głębokość wyjścia wynosi 1 nm). Typowe natomiast głębokości wyjścia dla różnych materiałów i energii promieniowania wzbudzającego są ekstremalnie krótkie, przeciętnie od 0.5 do 5 nm. Największą ilość informacji dostarczają fotoelektrony pochodzące z grubości około 10 nm, czyli z bardzo cienkiej warstwy na powierzchni. XPS jest, zatem wybitnie powierzchniową metodą, znakomicie nadającą się do badań przeważnie cienkich warstw.



Rys. 20. Wkład poszczególnych rejonów próbki położonych na różnych głębokościach do całkowitego natężenia emitowanych fotoelektronów dla kąta padającego kwantu  $45^\circ$ .

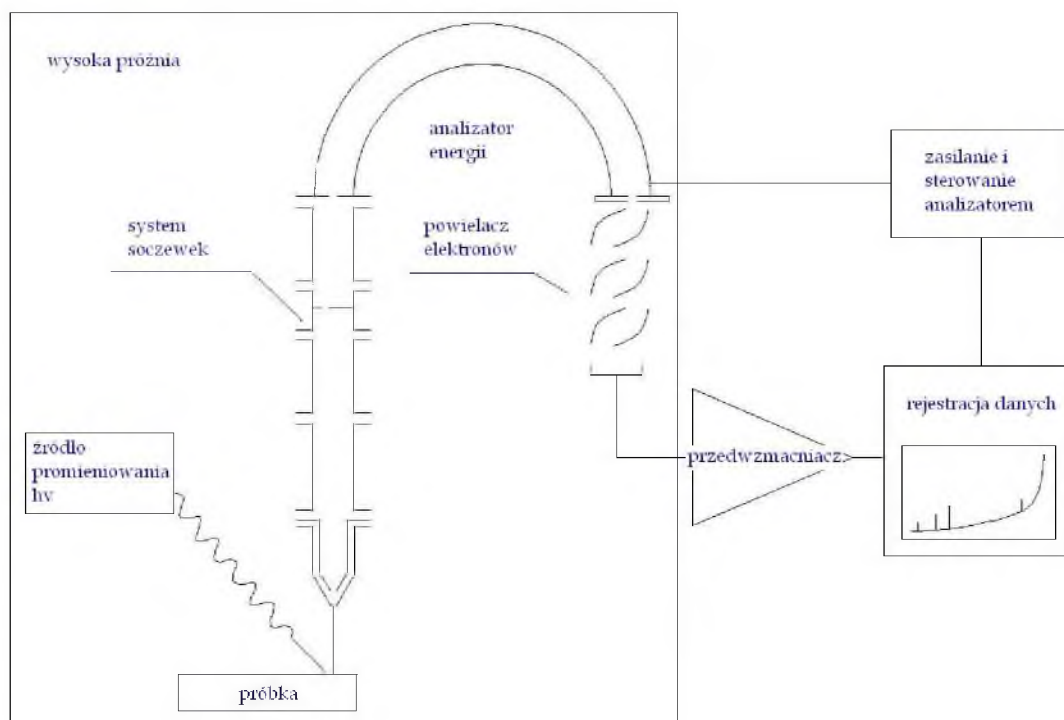
### 3.4. Budowa spektrometru XPS

Pomiar energii wiązania jest trudnym eksperymentem i wymaga unikatowej aparatury.

Podstawowymi elementami spektroskopu fotoelektronów są:

- źródło promieniowania rentgenowskiego  $h\nu$ ;
- analizator energii elektronów;
- układ detekcyjny;
- układ próżniowy;
- system mocowania próbki [53].

Na rysunku nr 21 przedstawiono schemat blokowy urządzenia stosowanego do badań w spektroskopii fotoelektronów.



Rys. 21. Schemat blokowy urządzenia stosowanego do badań w spektroskopii fotoelektronów [53, zmodyfikowano].

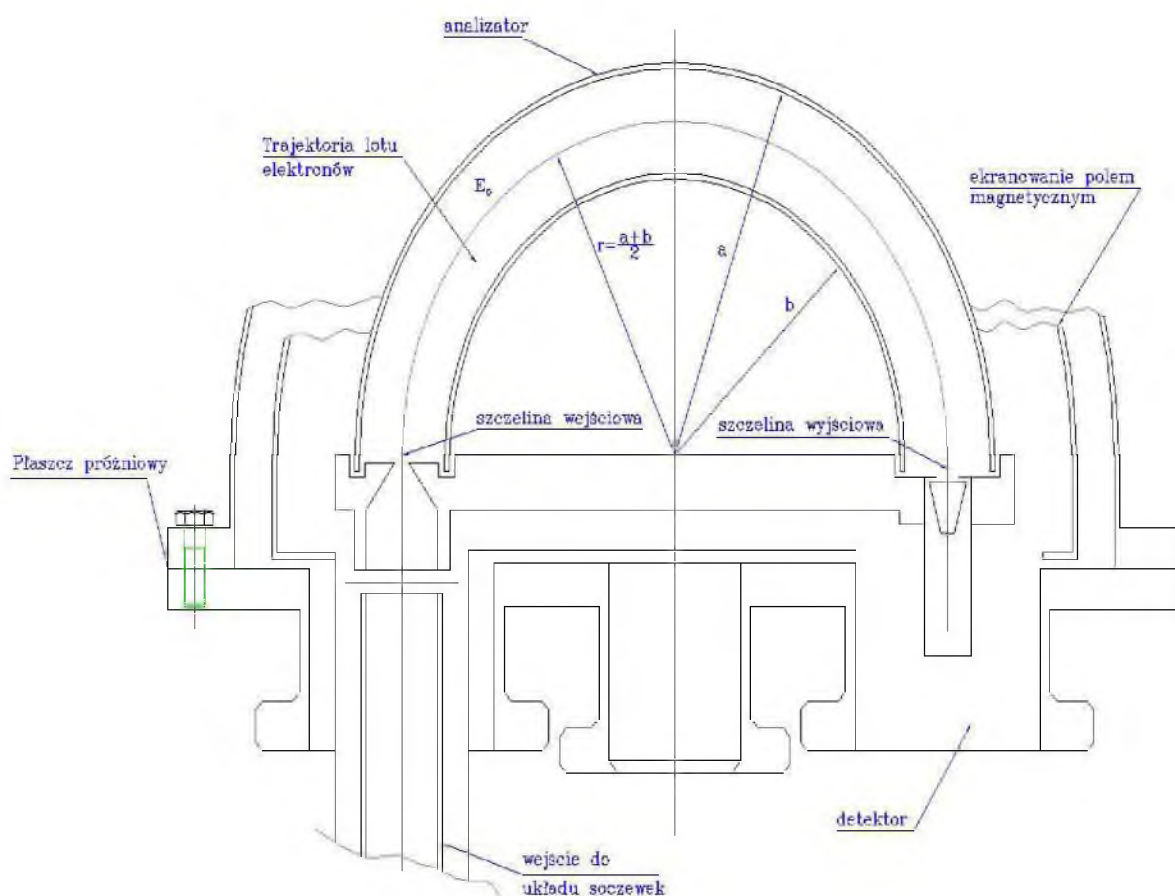
Zasadniczym elementem każdego spektrometru XPS jest analizator energii, dzięki któremu zostaje dokonany pomiar energii kinetycznej wybitych z próbki fotoelektronów. Powinien on spełniać dwa zależne od siebie warunki: musi mieć taką zdolność rozdzielczą, aby rejestrować linie elektronów o szerokościach równych lub zbliżonych do szerokości poziomów atomowych i jednocześnie mieć dużą wydajność tak, aby analizować i rejestrować jak największą liczbę elektronów. Ponieważ zdolność rozdzielcza zależy od analizowanej energii, większość urządzeń pomiarowych wyposażona jest w układ opóźniający, umieszczony przed wejściem do analizatora. Spowalnianie lub przyspieszanie elektronów do stałej energii przejścia ( $E_0$ ) nie zmienia bezwzględnego rozkładu widma energetycznego, a jednocześnie pozwala na pracę ze stałą zdolnością rozdzielczą [53, 61]. Ma to duże znaczenie w XPS, gdzie pożądane są szczegółowe informacje o rozkładach energetycznych, dla których zdolność rozdzielcza nie powinna zależeć od energii.

Wyróżniamy dwa główne typy analizatorów – magnetyczne i elektrostatyczne, wykorzystujące odpowiednio odbicie lub odchylenie elektronów, jednakże z czasem bardziej popularne stały się analizatory elektrostatyczne [50, 61].

Elektrony wyselekcjonowane przez analizator trafiają w następnej kolejności do detektora, który zapewnia wstępne wzmocnienie sygnału. Do najpowszechniej stosowanych obecnie układów detekcyjnych należą [55]:

- dynodowe powielacze elektronowe, charakteryzujące się znacznymi gabarytami, lecz dużą szybkością pracy;
- miniaturowe powielacze elektronowe, tzw. channel trony;
- płytki mikrokanalikowe (*channelplates*), zawierające dużą liczbę miniaturowych channeltronów, umożliwiających detekcję wielu elektronów równocześnie.

W przypadku płytek mikrokanalikowych ich rowki utrzymane są pod kątem  $45^\circ$  i mają szerokość równą długości fali światła. Padające na nie elektrony wytwarzają elektrony wtórne, a następnie szesnastokanałowy detektor zlicza prąd, dzięki czemu może być równocześnie mierzonych szesnaście zakresów energii. Na wyjściu detektora utrzymuje się sygnał elektryczny, który po wzmocnieniu jest rejestrowany [55].



Rys. 22. Układ detektora fotoelektronów spektrometru PHI5700/660 (zmodyfikowano) [55].

Fotoelektrony wybite z próbki i wpadające do analizatora muszą poruszać się w próżni, aby po drodze nie zderzać się z cząsteczkami gazu, co mogłoby doprowadzić do strat energii. Poza tym wspomniane cząsteczki gazu doprowadziłyby do pochłaniania promieniowania X. Występowanie tych dwóch zjawisk uniemożliwiłoby w konsekwencji przeprowadzenie pomiaru. W celu zapobiegnięcia ich występowaniu stosuje się pompy wstępne, turbomolekularne i jonowe, obniżające ciśnienie wewnątrz spektrometru do  $10^{-10}$  Pa. Ponadto ważnym warunkiem otrzymania wyraźnej struktury widm fotoelektronów jest dobry stan powierzchni próbki, przede wszystkim brak zanieczyszczeń na jej powierzchni. Zanieczyszczenie ma, bowiem wpływ na powierzchniową barierę potencjału, którą musi pokonać fotoelektron opuszczający próbkę, dlatego też pomiar wykonuje się w warunkach wysokiej próżni (rzędu nawet  $10^{-13}$  Pa) [61].

Spektrometr XPS umożliwia przygotowanie materiału do badań w kontrolowanej atmosferze, temperaturze ( $-160^{\circ}\text{C}$  do  $800^{\circ}\text{C}$ ) i ciśnieniu (do 1 atm). Jego znaczna automatyzacja pozwala na szybkie wprowadzanie próbek do komory pomiarowej oraz sterowanie pomiarem, obróbką i analizą danych za pomocą specjalnego oprogramowania [55]. Ważną zaletą tego spektrometru jest także możliwość badania bardzo małych powierzchni o średnicy  $30\text{ }\mu\text{m}$ .

### 3.5. Zastosowanie spektroskopii XPS

Widma fotoelektronów można otrzymywać głównie dla ciał stałych, przy czym ciecze sprawiają największe trudności, ponieważ utrudniają utrzymanie ultrawysokiej próżni na drodze wybitych elektronów w spektrometrze. W przypadku badania ciał stałych osobliwością widm fotoelektronów jest ograniczenie badań do cienkiej warstwy powierzchniowej, gdyż elektrony wybijane z molekuł są przechwytywane w głębi fazy stałej i nie mogą się wydostać na zewnątrz. Głębokość warstwy, z której wydostają się fotoelektrony i elektrony Auger'a, sięga od 0,4 do 5 nm. Dzięki temu ograniczeniu spektroskopia fotoelektronów i elektronów Auger'a oddaje nieocenione usługi w badaniach adsorpcji i katalizy [62, 64].

Każdy pik w rejestrowanym widmie XPS jest charakterystyczny dla pewnego poziomu energii elektronów mierzonych pierwiastków. Intensywność tych pików w widmie oraz ich położenie informują nas o składzie ilościowym i jakościowym badanej substancji, co daje możliwość przeprowadzenia jej elementarnej analizy. Jednakże, jak już wspomniano, mierzone energie wiązania w związkach nie są całkowicie stałe, ale zależą od chemicznego

otoczenia, z powodu zmian rozkładu elektronów walencyjnych. Możliwość badania tych różnic w energiach wiązania elektronów w odniesieniu do czystych pierwiastków, zwanych przesunięciem chemicznym, pozwala dokładnie zanalizować skład atomowy substancji, sposób rozmieszczenia atomów w cząsteczkach oraz rozróżnić atomy znajdujące się w różnych stanach walencyjnych [61, 65]. Używając katalogowych wartości przesunięć chemicznych możliwa jest identyfikacja danego związku, a badania energii wiązań elektronów w cząsteczce, pozwalają określić jej strukturę [60].

Zadaniem spektrometru jest przede wszystkim: analiza jakościowa wybitych fotoelektronów, tj. określenie ich energii kinetycznej oraz analiza ilościowa, tj. określenie liczby zliczeń elektronów o danej energii kinetycznej w jednostce czasu. Spektroskopia fotoelektronów pozwala wykryć prawie każdy pierwiastek znajdujący się w badanej substancji już w bardzo małych stężeniach. W związku z powyższym znalazła ona szerokie zastosowanie w chemii analitycznej. Metoda ta jest niedestrukcyjna, a próg wykrywalności danego pierwiastka wynosi nawet 0,01% atomowego [53]. Oprócz typowej analizy jakościowej i ilościowej można wykonać tzw. profile koncentracji (analiza składu chemicznego w funkcji głębokości przy odsłanianiu kolejnych powierzchni) lub mapy rozmieszczenia pierwiastków (przy zmianie obszaru powierzchni dającej fotoelektrony) [51].

Metoda spektroskopii fotoelektronów jest bardzo czuła na zmianę składu oraz struktury pasm walencyjnych. Analizując, więc położenie linii widmowych oraz ich intensywności, można dla złożonych cząsteczek, np. białkowych, określić nie tylko liczbę atomów w cząsteczce, ale także, z jakimi grupami atomów związany jest dany atom. Możliwość badawcza struktury wewnętrznej białek pozwala powiązać nawet niektóre cechy ich budowy chemicznej z czynnościami fizjologicznymi [53]. Zatem metoda ta przydaje się również w wielu innych dziedzinach nauki, takich jak:

- biologia (badanie różnego rodzaju obiektów biologicznych, w tym bakterii oraz biodegradacji polimerów);
- ochrona środowiska (np. precyzyjne i szybkie badania powierzchni mają duże znaczenie w badaniu katalizy, co prowadzi do dobrej konstrukcji katalizatorów np. samochodowych), badanie zanieczyszczeń powietrza, czy biodegradacji tworzyw sztucznych, itp.;
- medycyna (np. w badaniach nad włóknami węglowymi służącymi do tworzenia implantów, oddziaływanie antybiotyków ze sztuczną skórą, itp.);
- w badaniach właściwości magnetycznych różnego rodzaju substancji [53, 64].

Wykorzystany do badań Wielofunkcyjny Spektrometr Elektronów PHI 5700/660 jest światowej klasy przyrządem pozwalającym na badania dotychczas niedostępne na Śląsku. Dokonuje się na nim badania m.in. skażeń środowiska, biomateriałów, cienkich warstw ciał stałych, biopolimerów, szkła, ceramiki, półprzewodników, nadprzewodników, metali i ich stopów, czy kryształów i bakterii. Jego zakres możliwości pozwala przede wszystkim na:

- identyfikację pierwiastków oraz analizę ilościową składu chemicznego wszystkich pierwiastków za wyjątkiem wodoru z czułością od 0.1 do 1% w warstwie powierzchniowej materiału o grubości rzędu kilku nanometrów,
- identyfikację stanów chemicznych (wartościowość, energia wiązania),
- określenie struktury elektronowej,
- zbadanie ułożenia atomów w warstwach przypowierzchniowych oraz na powierzchni,
- określenie rozkładu atomów i związków adsorbowanych na powierzchni,
- znalezienie rozkładu pierwiastków i faz wewnątrz preparatu w różnej odległości od jego powierzchni,
- otrzymywanie obrazu badanej powierzchni w funkcji rozkładu zadanego pierwiastka [66, 67].

Głównymi technikami badawczymi, z których można korzystać dzięki temu wielofunkcyjnemu spektrometrowi są:

- XPS (*X-Ray Photoelectron Spectrometry*) – spektrometria fotoelektronów wzbudzonych promieniami rentgenowskimi;
- UPS (*Ultraviolet Photoelectron Spectrometry*) – spektrometria fotoelektronów wzbudzonych promieniami ultrafioletowymi;
- AES (*Auger Electron Spectrometry*) – spektrometria elektronów Auger'a [67].

### 3.6. Przebieg pomiarów – Spektrometr fotoelektronów XPS

Pomiar struktury elektronowej metodą XPS dla wszystkich próbek prezentowanych w części doświadczalnej został wykonany przy użyciu spektrometru fotoelektronów wzbudzonych promieniami rentgenowskimi. Uzyskane widma rozkładu energii fotoelektronów analizowano przy pomocy analizatora hemisferycznego z rozdzielczością energii ok. 0.3 eV. Wszystkie rejestrowane fotoelektrony pochodziły z małego obszaru próbki. W każdym przypadku zostało użyte działo elektronowe z powodu efektu ładowania, który występuje dla próbek nieprzewodzących (izolatorów), do których należą preparaty



biologiczne. Kontrola emisji i energia elektronów dobierane były w ten sposób, aby otrzymać najwyższe i stabilne w pozycji linie. Wszystkie badania prowadzono w ultrawysokiej próżni rzędu  $10^{-7} - 10^{-10}$  Pa, a jako pierwsze wykonywano pomiary pełnego widma przeglądowego w szerokim zakresie energii (0 – 1 400 eV) w celu zidentyfikowania wszystkich pierwiastków występujących w danej próbce. W dalszej kolejności zostały zmierzone dokładniej pojedyncze główne linie poziomów rdzenia węgla (C1s), tlenu (O1s) i azotu (N1s) oraz VB w zakresie pasma walencyjnego do 33 eV. Widma przeglądowe XPS były mierzone w temperaturze pokojowej, a czas trwania pojedynczego pomiaru mieścił się w granicach od 20 minut do 1 godziny. Energię wiązania poszczególnych pierwiastków odnoszono do poziomu linii neutralnego węgla C1s o  $E_W = 285.0$  eV. Opracowanie wyników analizy widm spektralnych dla każdej próbki zawsze, zatem zaczynano od dopasowywania regionu węgla (C1s), przesuwając odpowiednio skalę energii w ten sposób, aby właśnie ta linia przyjęła powyższą wartość. Następnie, takie samo przesunięcie skali energii wiązania (maksymalnie o kilka eV) stosowano dla widm wszystkich linii spektralnych danej próbki, uzyskanych w czasie tego samego pomiaru. Otrzymane dane przesyłano dalej do komputera pełniącego rolę układu rejestrującego i przedstawiano w postaci widm.

W oparciu o widma przeglądowe XPS, w zakresie energii 0 – 1 400 eV, określono średnie stężenia atomowe (wyrażone w % atomowych) następujących pierwiastków, występujących na powierzchni badanych bakterii, były to: O, C, N, P, Si, Ca, Al, S, Mg, Na, K, Cl, F. Wszystkie wyniki opracowywano przy wykorzystaniu programu *Multipak Physical Electronics*, który umożliwia analizę jakościową i ilościową widm XPS. Do opracowania widm natomiast wykorzystano dedykowane do tego celu programy graficzne *SimPeak* i *EasyPlot*.

#### 4. Podstawy fizyczne techniki SEM

Współcześnie elektronowa mikroskopia skaningowa (SEM - *Scanning Elektron Microscope*) stała się rozwiniętą metodą badawczą, wykorzystującą wiązkę elektronów oraz ich oddziaływanie z materią. Pozwala to uzyskać wiele ważnych informacji dotyczących analizowanych próbek biologicznych oraz ciał bezpostaciowych, w skali mikrometrycznej oraz nanometrycznej. Najwcześniejsze modele i konstrukcje mikroskopu były prostymi układami elektronooptycznymi. Niemcy Maks Knoll i Ernst Ruska w 1932 roku, jako pierwsi skonstruowali mikroskop elektronowy. Było to 35 lat po odkryciu elektronu i kilka lat po skonstruowaniu pierwszych soczewek magnetycznych i elektrostatycznych. W 1986 roku Ruska otrzymał za to nagrodę Nobla z fizyki. Pierwszy mikroskop elektronowy użytkowy wyprodukowała w 1938 roku firma Siemens, jednak na osiągnięcie atomowej zdolności rozdzielczej, trzeba było czekać około 30 lat, gdyż tyle czasu potrwała korekcja aberracji soczewek [68].

Mikroskop elektronowy często jest porównywany do mikroskopu optycznego, ponieważ zarówno optyka w mikroskopii elektronowej jak i świetlnej jest bardzo podobna, jednakże, istnieją między nimi pewne różnice. Przyspieszane elektrony posiadają o wiele mniejszą długość fali niż długość fali światła widzialnego, bądź fotony promieniowania UV, dzięki czemu mikroskopia elektronowa pozwala uzyskać dużo większą rozdzielczość w porównaniu do mikroskopii świetlnej. Kolejną istotną różnicą jest to, że elektrony oddziałują z materią znacznie silniej niż fotony [69], przez co konieczne jest stosowanie próżni, co najmniej  $10^{-4}$  Pa. Elektrony posiadają ładunek, dlatego też ich wiązka może zostać zogniskowana poprzez zastosowanie pola elektrycznego bądź magnetycznego. Wykorzystując pole elektrostatyczne, zogniskowaną wiązkę elektronów można w prosty sposób kontrolować [68].

Podstawą wynalazku mikroskopu elektronowego o większej zdolności rozdzielczej niż mikroskop świetlny było przede wszystkim odkrycie elektronu przez Josepha J. Thompsona w 1896 roku, następnie odkrycie dwoistej natury falowo-korpuskularnej elektronów przez Victorade Broglie w 1924 roku oraz użycie pola magnetycznego, jako soczewki skupiającej elektrony przez Hansa Busha w 1926 r.

Idea działania skaningowego mikroskopu elektronowego polega na „bombardowaniu” powierzchni próbki przez wiązkę elektronów, zogniskowaną do bardzo małej plamki. W wyniku takiego zjawiska pojawiają się elektrony rozpraszane elastycznie oraz elektrony wybite z powierzchni, które są następnie rejestrowane przez odpowiednie detektory

i przetwarzane na obraz próbki lub widmo promieniowania rentgenowskiego [68]. Wiązka ta zwykle o wielkości średnicy rzędu kilku nanometrów, skanuje dany fragment powierzchni w sposób liniowy i jest zsynchronizowana z wiązką elektronów padającą na ekran komputera. To w efekcie daje możliwość analizy topografii powierzchni, a zmiana powiększenia automatycznie powoduje zmianę powierzchni skanowania.

Teoretycznie mikroskop skaningowy powinien umożliwiać obserwację poszczególnych atomów. Według hipotezy de Broglie'a ściśle związanej z dualizmem korpuskularno-falowym, każdy obiekt materialny może być opisywany na dwa sposoby, jako zbiór cząstek albo, jako fala. Dzięki temu, że długość fali materii dla elektronu jest bardzo mała w porównaniu z długością fali światła, elektrony doskonale nadają się do obserwacji małych obiektów. Zostało to, więc wykorzystane do budowy mikroskopu elektronowego, który ma wielokrotnie wyższą rozdzielczość od mikroskopu optycznego.

Wzór  $\lambda = \frac{h}{p}$  określa długość fali De Broglie'a, czyli długość fali materii stowarzyszonej z ruchem cząstki materialnej o pędzie  $p$  [68].

Zgodnie z tą teorią każdy obiekt materialny zachowuje się jak pakiet falowy o długości fali:

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{\sqrt{2m_e E_k}}$$

gdzie:  $\lambda$  – długość fali cząstki;

$h$  – stała Plancka ( $4.14 \times 10^{-15}$  eVs);

$p$  – pęd cząstki;

$m_e$  – masa elektronu;

$E_k$  – energia kinetyczna.

Energia elektronu wyrażona jest w elektronowoltach, natomiast długość fali w nanometrach.

Ważnym elementem takiego mikroskopu jest jego zdolność rozdzielcza, określona za pomocą wielkości plamki wiązki skanującej tzw. spotu oraz przez rozproszenie elektronów wchodzących w skład tej wiązki w próbce. Związana jest ona również z absorpcją promieniowania rentgenowskiego przez detektor. Elektrony z pierwotnej wiązki skanującej są rozpraszane w badanym materiale i stąd rozmiary tej wiązki rosną szybko wraz z głębokością. Elektrony wtórne natomiast są bardzo szybko pochłaniane ze względu na ich małą energię. Do detektora docierają jedynie elektrony wybite z najbardziej zewnętrznych warstw powierzchniowych, gdyż jedynie dla nich wiązka pierwotna nie uległa znacznemu

rozproszeniu. Z pomiaru energii elektronów można następnie określić jak głęboko nastąpiło rozproszenie, co dalej pozwala na uzyskanie informacji o strukturze głębokościowej próbki.

#### 4.1. Skaningowy mikroskop elektronowy SEM

Mikroskop elektronowy to przyrząd elektrooptyczny, w którym powiększony obraz uzyskuje się dzięki wiązce elektronów, odchylonej i skupionej przez soczewki elektronowe. Mikroskopy tego typu mają zdolność rozdzielczą do 0,2 nm, dzięki czemu mogą być wykorzystywane do obserwacji morfologii powierzchni, przekrojów i przełomów różnych próbek, w tym preparatów biologicznych. Jest on, zatem podstawowym narzędziem pomiarowo-badawczym stosowanym w wielu badaniach, m. in.: biologicznych, medycznych, krystalograficznych oraz w fizyce ciała stałego [68].

Ze względu na budowę, parametry techniczne oraz zastosowanie, wśród skaningowych mikroskopów elektronowych możemy wyróżnić kilka ich rodzajów:

- 1) Wysokopróżniowe skaningowe mikroskopy elektronowe z emisją polową– SEM FE (*Field Emission*) z zimną katodą oraz SEM FEG (*Field Emission Gun*) z gorącą katodą. Są to mikroskopy o dużej zdolności rozdzielczej, dzięki czemu możliwe jest bardzo dokładne odwzorowanie ultrastruktury badanej próbki. Największą ich wadą jest bezwzględny wymóg wysokiej próżni w komorze preparatu, a także podatność na wpływ czynników zewnętrznych, jak drgania mechaniczne czy pole magnetyczne.
- 2) Wysokopróżniowe skaningowe mikroskopy elektronowe – SEM HV (*High Vacuum*). Są to zautomatyzowane mikroskopy, charakteryzujące się bardzo dobrymi parametrami technicznymi oraz analitycznymi. Umożliwiają analizę składu pierwiastkowego badanej próbki (katoda wolframowa) i charakteryzują się wysoką rozdzielczością obrazu (katoda LaB<sub>6</sub>).
- 3) Skaningowe mikroskopy elektronowe z niską lub zmienną próżnią– SEM LV (*Low Vacuum*) lub SEM VP (*Variable Pressure*). Mikroskopy te umożliwiają obrazowanie w szerokim zakresie ciśnień w zależności od wymogów danej próbki, również preparatów nieprzewodzących prąd elektryczny (niewielkie powiększenia).
- 4) Skaningowe środowiskowe mikroskopy elektronowe – ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscope*). Są to mikroskopy umożliwiające badanie próbek w ich stanie niezmienionym (zanieczyszczone, zawierające olej lub wodę, ciekłe, nieprzewodzące prąd) bez konieczności wcześniejszej preparacji i jednocześnie z zachowaniem wysokorozdzielczych obrazów w dużych powiększeniach. Możliwe są

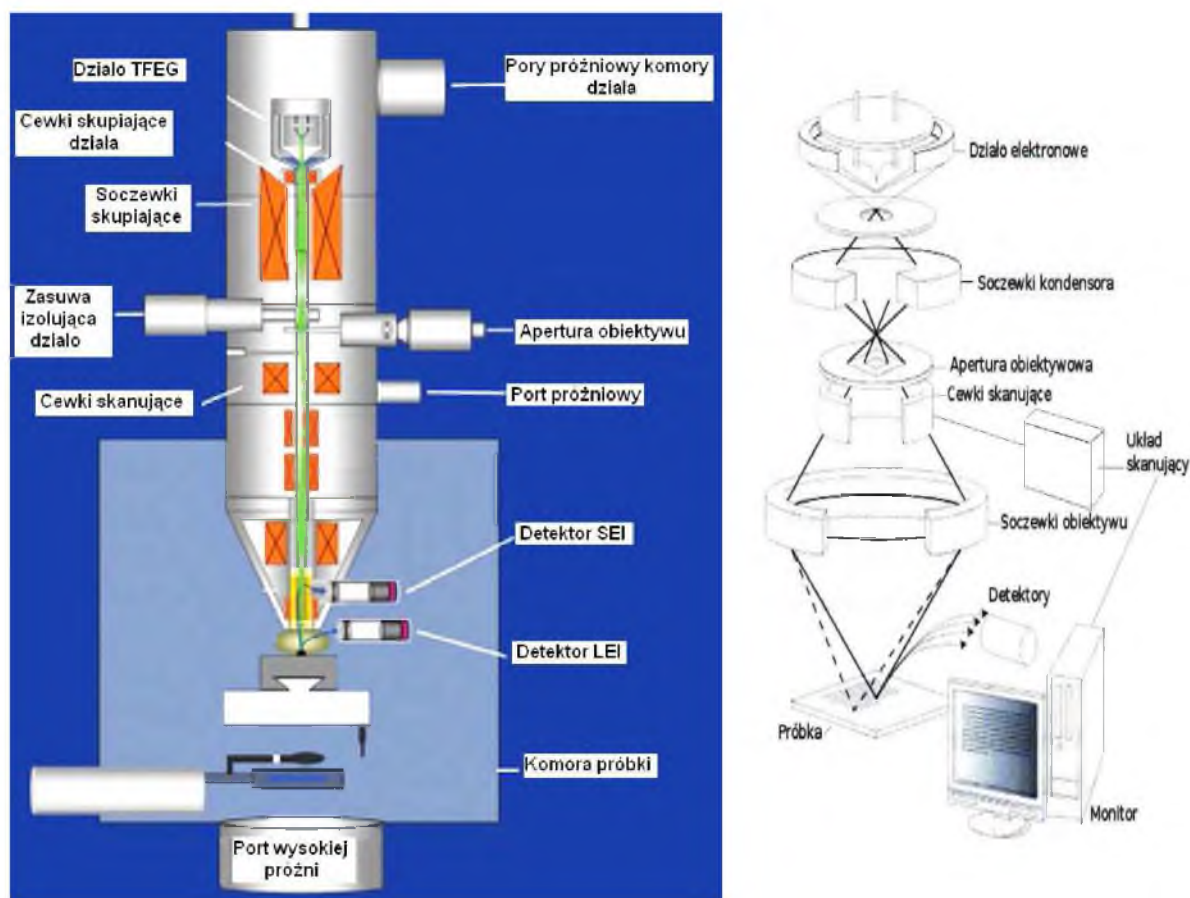
również analizy składu pierwiastków oraz badania procesów dynamicznych próbki. Ogromną zaletą jest możliwość kontrolowania atmosfery w komorze preparatu [69].

#### 4.2. Budowa mikroskopu SEM

Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) składa się z następujących podstawowych elementów:

- działo elektronowe, gdzie wytwarzana jest wiązka elektronów;
- kolumna, w której następuje przyspieszenie i ogniskowanie wiązki elektronów;
- komora próbki, gdzie mają miejsce interakcje elektronów wiązki z próbką;
- zestaw detektorów odbierających różne sygnały emitowane przez próbkę;
- system przetwarzania sygnałów na obraz.

Taki układ elementów w mikroskopie pozwala na uzyskanie skupionej wiązki elektronów, a następnie na skanowanie powierzchni próbki wymuszając emisję sygnałów, które po zarejestrowaniu przez odpowiedni detektor przekształcane są w obraz [69].



Rys. 23. Schemat budowy elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) [71].

Kolumna mikroskopu jest bazowym elementem mikroskopu, w którym znajdują się wszystkie układy związane z optyką pierwotnej wiązki elektronowej. Zadaniem tego układu jest wytworzenie wiązki elektronów, zogniskowanie jej oraz skanowanie próbki. Przy czym, podstawowym elementem kolumny mikroskopu jest działło elektronowe, czyli urządzenie odpowiedzialne za wytwarzanie wiązki elektronów. Możemy wyróżnić kilka rodzajów działł elektronowych: wolframowe,  $\text{LaB}_6$  (*lanthanum hexaboride*) używane głównie w większości starszych typów SEM oraz stosowane w nowszych typach działła z emisją polową. W przypadku tych ostatnich podstawowymi zaletami są:

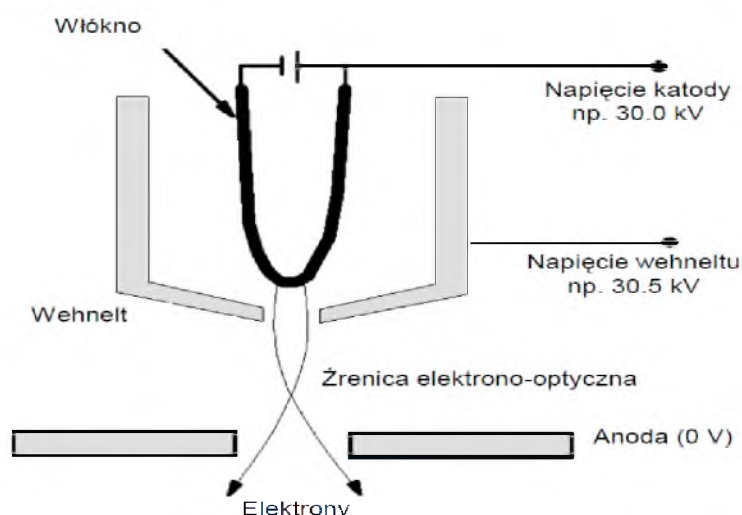
- większa wydajność,
- niezawodność,
- dłuższa żywotność.

Wykonane mogą być z różnych materiałów, a ich działanie opiera się na różnych zjawiskach fizycznych. Wszystkie jednak mają za zadanie wytworzenie wiązki elektronów o stabilnym i wystarczającym prądzie przy możliwie małej średnicy wiązki [70, 71].

Działło elektronowe składa się z trzech części (Rys. 24):

- wygiętego w kształcie litery „V” wolframowego drutu o średnicy 100  $\mu\text{m}$ , służącego jako katoda (elektroda ujemna);
- cylindra Wehnelta;
- anody (elektrody dodatniej).

Katoda i cylinder Wehnelta połączone są ujemnym potencjałem elektrycznym, a anoda i pozostałe elementy kolumny mikroskopu – potencjałem zerowym. Katoda działła elektronowego rozgrzana do temperatury 1 000°C, przepływającym prądem elektrycznym, emituje elektrony w procesie termoemisji. Napięcie między umieszczoną w dolnej części działła anodą, a cylindrem Wehnelta to tzw. napięcie przyspieszające elektronów. Od niego zależy energia elektronów oraz długość emitowanej fali. Pole elektrostatyczne w działle elektronowym kieruje wyemitowane z niewielkiego obszaru na powierzchni katody elektrony do małego otworu – źrenicy elektrono-optycznej [72]. Skupienie wiązki jest osiągane przy wykorzystaniu pola elektrostatycznego wytworzonego przez cylinder Wehnelta, który znajduje się na drodze wiązki między katodą, a anodą. Cylinder ten jest soczewką elektrostatyczną, wytwarzającą ujemne pole potencjału, powodujące odpychanie elektronów. Skutkiem, tego wiązka zostaje wstępnie skupiona i skierowana do dalszej części mikroskopu, gdzie elektrony są przyspieszane w kierunku próbki, z energią od kilkuset do kilkudziesięciu tysięcy elektronowoltów (ok. 100 – 30 000 eV) [69].



Rys. 24. Schemat budowy działu elektronowego.

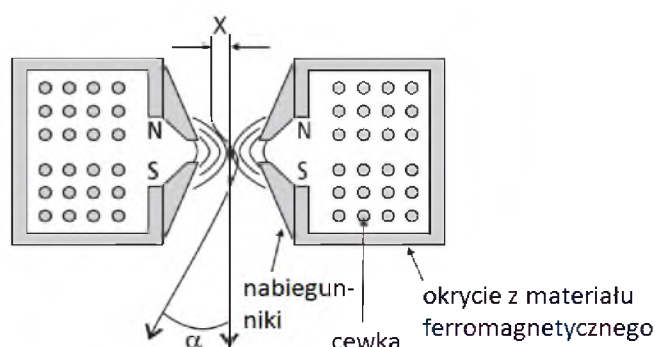
Poniżej działu elektronowego znajduje się układ soczewek elektromagnetycznych odpowiedzialnych za uformowanie wiązki elektronów i bezpośrednio wpływający na jej drogę przemieszczania w dół tuby próżniowej. Rozbieżna wiązka elektronów wydostająca się z działu elektronowego zyskuje tu zbieżność, poprzez zogniskowanie zestawu soczewek magnetycznych i apertur w kolumnie.

Układ soczewek elektromagnetycznych w mikroskopie SEM zbudowany jest z:

- cewek centrowania wiązki – umiejscowionych tuż pod działem elektronowym i odpowiedzialnych za odchylenie wiązki w taki sposób, aby przebiegała ona centrycznie wzdłuż osi kolumny mikroskopu;
- soczewek kondensora – odpowiedzialnych za skupienie wiązki elektronów;
- apertury obiektywowej – mającej postać otworków umieszczonych w osi optycznej mikroskopu, eliminujących najbardziej oddalone od osi elektrony, a tym samym, dodatkowo koncentrujące wiązkę elektronów;
- stygmatora – kompensującego zjawisko astygmatyzmu;
- cewek skanujących – odpowiadających za regulację wielkości skanowanego obszaru, czyli za powiększenie oraz za szybkość skanowania;
- obiektywu – ostatecznie formującego wiązkę elektronów w plamkę [73].

Pojedyncza z kolei soczewka elektromagnetyczna składa się z cewki z uzwojeniem obudowanym materiałem ferromagnetycznym, w środku, którego znajduje się szczelina pełniąca funkcję nabiegunnika. Skupia ona pole magnetyczne na niewielkim odcinku soczewki i uniemożliwia pełne zamknięcie pola magnetycznego w płaszczu

ferromagnetycznym. Krawędzie szczeliny są biegunami magnesu (N i S), wokół których w ściśle określony sposób układają się linie sił pola magnetycznego, a kształt tych linii jest bardzo precyzyjnie ustalany przez nabiegunniki soczewki. (Rys. 25). Tak ukształtowane pole magnetyczne jest „soczewką” dla wiązki elektronów. Zmiana natężenia prądu płynącego przez uzwojenie soczewki powoduje zmianę natężenia pola magnetycznego, a tym samym, zmianę kąta odchylenia wiązki elektronów. Dzięki tej właściwości soczewek elektromagnetycznych możliwa jest płynna zmiana ogniskowej soczewek, bez konieczności ich wymiany lub przemieszczania [69].



Rys. 25. Schemat soczewki elektromagnetycznej.

Zestaw cewek skanujących u podnóża kolumny odpowiada za przemieszczanie wiązki elektronów w obszarze skanowania. Soczewka obiektywu ogniskuje wiązkę w jak najmniejszą plamkę (spot) na powierzchni próbki. Utrudnione jest to przez występowanie różnego rodzaju aberracji, m.in.: aberracji chromatycznej, wynikającej z braku odpowiednich monochromatorów, umożliwiających dostarczanie elektronów naładowanych o niewielkim rozrzucie energii (cząstki o mniejszej energii są załamywane silniej niż cząstki o wysokiej energii) oraz aberracji sferycznej, polegającej na tym, że elektrony będące dalej od osi optycznej są załamywane silniej niż cząstki leżące blisko niej. Mimo, że wady soczewek można korygować, w praktyce skaningowa mikroskopia elektronowa nigdy nie osiąga rozdzielczości atomowej.

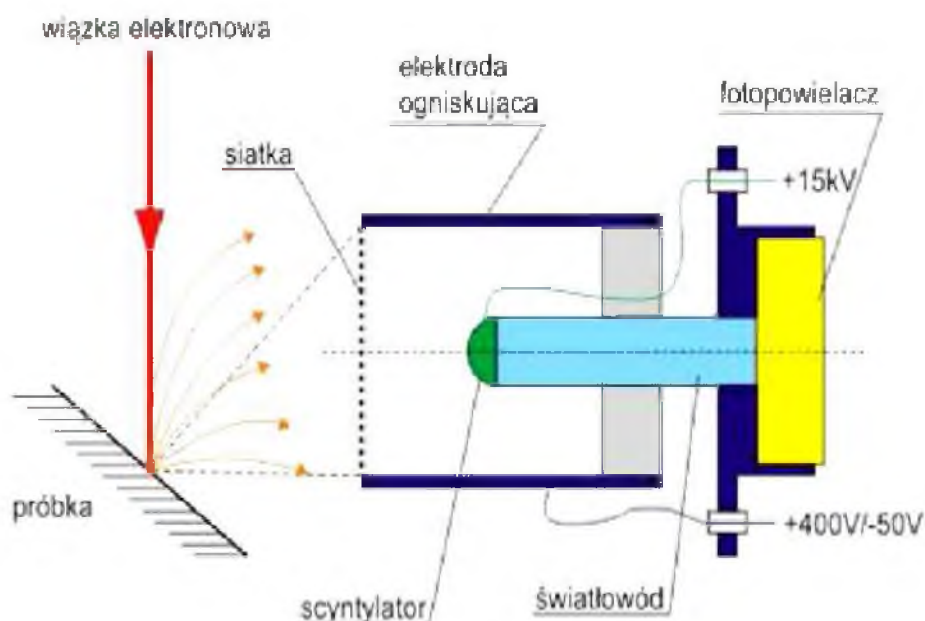
### Komora pomiarowa

Pod kolumną mikroskopu umieszczona jest komora pomiarowa preparatu z ruchomym stolikiem do mocowania próbki, umożliwiającym przesuwanie badanego materiału w trzech kierunkach oraz detektory rejestrujące sygnały emitowane z niej pod wpływem padającej wiązki elektronów. Przy czym, detektory sygnałów zbudowane są zwykle z elektrody ogniskującej, scyntylatora, światłowodu i fotopowielacza. Ich budowa zależy od typu



sygnału, który ma być przez nierejestrowany, ze względu na różne energie tych elektronów. Stosuje się, zatem do ich wychwytywania różne detektory, co z kolei powoduje różnice w kontraście obrazu preparatu.

Do detekcji elektronów wtórnych standardowo używa się detektora Everharta-Thornleya [74]. Jego schemat przedstawiony jest na rys. 26. Znajduje się on zwykle w cylindrycznej ścianie z boku komory. Jego elektroda ogniskująca zaopatrzona jest w siateczkę metalową pełniącą rolę analizatora energii. W zależności od napięcia elektrody ogniskującej, możliwa jest detekcja elektronów wtórnych (+400 V) lub wstecznie rozproszonych (-50 V). W wypadku elektronów wtórnych spolaryzowana jest ona niewielkim napięciem ok. 400 V, dzięki czemu przyciąga prawie wszystkie elektrony wtórne wybite z preparatu, przy czym napięcie to nie wpływa na elektrony wstecznie rozproszone [75]. Ze względu na wysoką energię, jaką mają te elektrony, w pierwszym przybliżeniu można powiedzieć, że poruszają się po liniach prostych, dlatego w związku z małą średnicą otworu elektrody ogniskującej i znaczną odległością detektora od stolika przedmiotowego tylko niewielka ich liczba może dotrzeć do scyntylatora. Scyntylator detektora to natomiast plastikowy krążek z naniesionym luminoforem o krótkim czasie poświaty, który przekształca energię elektronów wtórnych w impulsy świetlne, które w dalszej kolejności są wzmacniane przez fotopowielacz. Pochodzący z detektora sygnał steruje jasnością obrazu powstającego na monitorze [75, 76].



Rys. 26. Schemat detektora Everharta-Thornleya [75].

Półprzewodnikowy detektor elektronów wstecznie rozproszonych ma natomiast kształt pierścienia i jest umieszczony w bocznej ścianie komory mikroskopu lub pod obiektywem. Działa na zasadzie generacji par elektron-dziura przez elektrony wnikaające w obszar złącza p-n. Detektory takie charakteryzują się małymi rozmiarami [75]. Kontrast obrazu elektronów wstecznie rozproszonych jest zróżnicowany w zależności od topografii i materiału próbki oraz rodzaju detektora. Większość tych elektronów cechuje się energią zbliżoną do energii wiązki padającej, zależną od liczby atomowej pierwiastka rozpraszającego. Stąd nie potrzebują one dodatkowego pola przyspieszającego by dotrzeć do scyntylatora, docierają, bowiem tylko wysokoenergetyczne elektrony skierowane w kierunku detektora [68, 69].

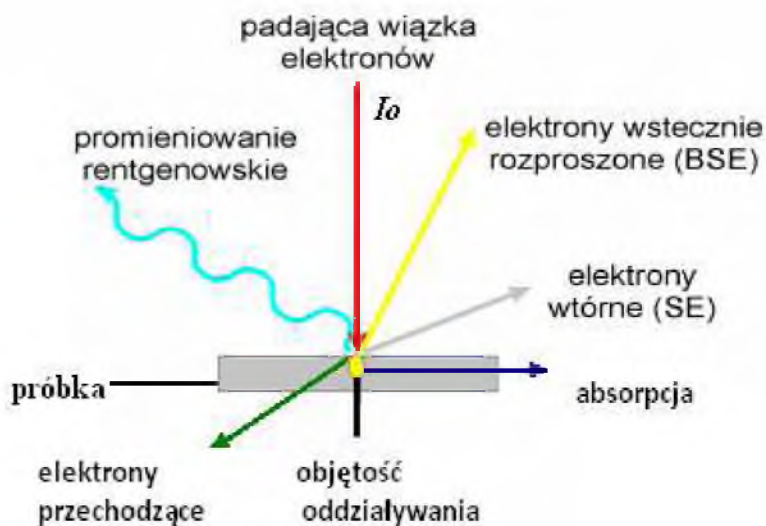
### **Układ próżniowy**

Dodatkowo do mikroskopu przyłączony jest układ pomp próżniowych, dzięki którym możliwe jest otrzymanie w urządzeniu wysokiej próżni (ok.  $10^{-5}$  Pa), co jest niezbędne do prawidłowej pracy skaningowego mikroskopu elektronowego, aby elektrony nie ulegały rozproszeniu. Taki układ próżniowy składa się z dwustopniowego systemu z pompą rotacyjną i turbomolekularną, a sterowany i kontrolowany jest przez niezależny mikroprocesor komunikujący się z głównym komputerem sterującym. Taka próżnia panująca we wnętrzu kolumny i w komorze mikroskopu, zapobiega rozpraszaniu wiązki elektronów, a próbki nie ulegają zanieczyszczeniu. Pomiar próżni natomiast jest dokonywany przez dwie sondy próżniowe Piraniego, umieszczone w komorze pomiarowej oraz kolumnie mikroskopu. Próżniowy układ w standardowym mikroskopie SEM zawiera również system zaworów umożliwiających np. wymianę próbki bez konieczności zapowietrzania kolumny mikroskopu [68, 69].

### **4.3. Oddziaływanie wiązki elektronów z materiałem próbki**

Wytwarzana przez działo elektronowe i skupiona w kolumnie mikroskopu wiązka elektronów jest przemieszczana po badanym obszarze preparatu podobnie jak w kineskopie telewizyjnym, tj. wzdłuż kolejnych, równoległych linii. Padając na próbkę wywołuje szereg różnych efektów, które mogą zostać użyte, jako źródło potencjalnego sygnału. Elektrony wiązki zderzając się z atomami próbki wytracają energię kinetyczną, powodując emisję promieniowania, ale mogą także zostać całkowicie zaabsorbowane przez materię próbki,

przejsć przez nią lub ulec odbiciu (Rys. 27). Elektrony zaabsorbowane powodują emisję ciepła, a stosunek ich liczby do liczby elektronów odbitych i przechodzących uzależniony jest od grubości i składu chemicznego próbki, przy czym im cieńsza próbka tym więcej elektronów wiązki przechodzi przez nią [69].



Rys. 27. Efekty oddziaływania wiązki elektronów z materiałem [69].

Elektrony w wyniku oddziaływania z materiałem próbki mogą zostać także rozproszone, przy czym może to być rozproszenie elastyczne, kiedy to elektrony zmieniają kierunek na skutek oddziaływania z jądrami atomowymi, bez zmiany swojej energii. Mogą również ulec rozproszeniu nieelastycznemu, co ma miejsce w przypadku, kiedy elektrony wiązki zmieniają kierunek na skutek oddziaływania z elektronami atomów próbki, wytrącając przy tym swoją energię [72].

Zmianę intensywności wiązki elektronów następującą w wyniku rozpraszania nieelastycznego można obliczyć ze wzoru.:

$$I = I_0 \cdot \exp(-c \cdot \rho \cdot d)$$

gdzie:

$I_0$  – intensywność wiązki padającej (pierwotnej);

$c$  – stała proporcjonalna do  $Z/A$  ( $Z$  jest liczbą atomową,  $A$  – masą atomową) zależna od napięcia przyspieszającego wiązkę elektronów;

$\rho$  – gęstość materiału (próbki);

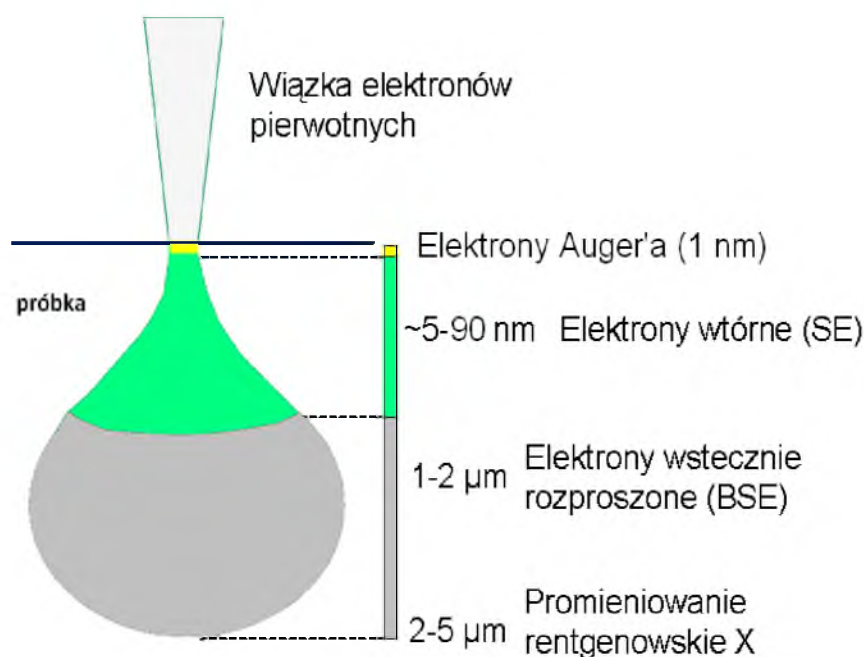
$d$  – grubość próbki.

Z powyższego wzoru wynika, że intensywność rozpraszania uzależniona jest od grubości próbki, gęstości materiału budującego oraz jej składu chemicznego [69].

W wyniku oddziaływania z elektronami próbki, wiązka padająca powoduje emisję różnych sygnałów, są to:

- elektrony wtórne,
- elektrony wstecznie rozproszone,
- elektrony Augera,
- promieniowanie rentgenowskie ciągłe,
- promieniowanie rentgenowskie charakterystyczne,
- promieniowanie fluorescencyjne.

Każdy rodzaj promieniowania emitowany jest z innej głębokości próbki, jednocześnie dostarczając inne, dodatkowe informacje o badanej próbce, co ilustruje schemat poniżej [69, 74, 75].



Rys. 28. Schemat wielkości obszarów, z których pochodzą różne rodzaje sygnałów emitowane przez próbkę podczas bombardowania przez wiązkę elektronów (zmodyfikowano) [69].

Z warstwy najbliższej powierzchni próbki tj. od 0,1 do 1 nm, emitowane są elektrony Auger'a, przede wszystkim przez atomy pierwiastków lekkich. Mają charakterystyczną energię ok. 10 do 1 000 eV, zależną od liczby atomowej pierwiastka. W związku z tym, że elektrony te powstają podczas relaksacji wzbudzonego atomu, ich energia jest charakterystyczna dla danego pierwiastka, co umożliwia jego identyfikację. Wykorzystywane

są one, zatem do badania składu chemicznego cienkiej, przypowierzchniowej warstwy badanego materiału [68].

Z głębszej warstwy próbki, od ok. 5 do 90 nm, emitowane są elektrony wtórne (SE – ang. *Secondary Electrons*), czyli elektrony wybite z wewnętrznych powłok elektronowych (zwykle K) atomów próbki na skutek zderzeń niesprężystych z elektronami pierwotnymi (elektronami wiązki). Te niskoenergetyczne sygnały są najistotniejsze w SEM, przy czym w metodzie tej, wtórnymi nazywa się tylko te elektrony, których energia jest mniejsza od 50 eV. Głębokość, na której są one generowane uzależniona jest od głębokości wnikanía wiązki pierwotnej do preparatu. Mimo to do analizy nadają się jedynie elektrony wtórne z cienkiej, przypowierzchniowej warstwy próbki. Związane jest to z tym, że elektrony te mają niewielką energię początkową, na skutek, czego są łatwo absorbowane. Ostatecznie z powierzchni próbki wychodzą elektrony, które na koniec mają wystarczającą energię, aby pokonać pracę wyjścia z materiału. Dzięki temu otrzymujemy obrazy o wysokiej rozdzielczości, z dużymi kontrastami i plastycznym odwzorowaniem nierówności powierzchni. Obszar wzbudzenia leży, bowiem blisko powierzchni, dlatego więcej elektronów wtórnych może uciec z punktów na szczycie nierówności, niż z punktów na dnie zagłębienia. Partie wypukłe, są tym samym na obrazie jasne, natomiast partie wklęsłe są ciemne. Daje nam to wyraźny kontrast topograficzny i łatwą interpretację obrazów SE [76, 77].

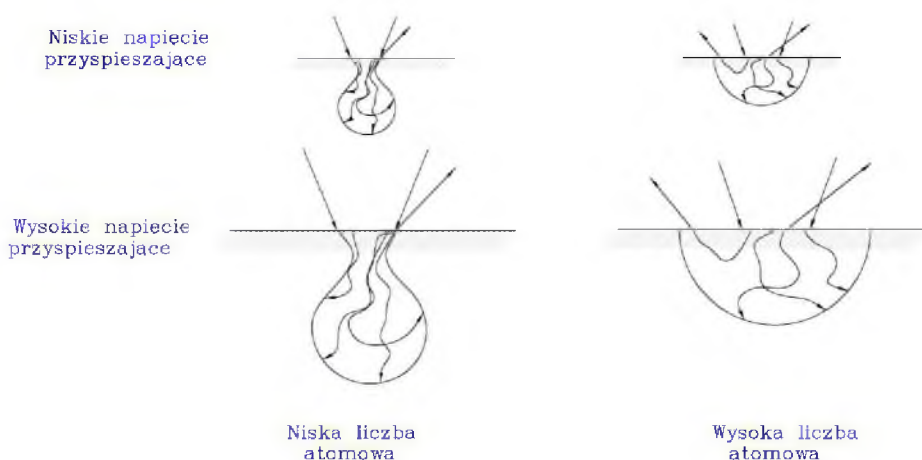
W związku z tym, że sygnał elektronów wtórnych nie jest zależny od liczby atomowej i gęstości próbki, ale od kąta padania wiązki pierwotnej, jego detekcja wykorzystywana jest do tworzenia obrazów ukazujących topografię próbki [68].

Elektrony wstecznie rozproszone (BSE – ang. *Back Scattered Electrons*) to elektrony wiązki pierwotnej, wielokrotnie odbijające się od atomów materiału próbki, na skutek zderzeń sprężystych z jądrami atomów. Elektrony te, emitowane są z dość dużych głębokości, bo od 1 do 2  $\mu\text{m}$  [78]. Mają wysoką energię po wyjściu z materiału próbki, przyjmuje się, że może ona wynosić od 50 eV aż do wielkości napięcia przyspieszającego wiązki, co odróżnia je od elektronów wtórnych. Rozpraszanie wsteczne elektronów uzależnione jest od liczby atomowej  $Z$  i tak, atomy pierwiastków lekkich (o niskiej liczbie atomowej  $Z$ ) generują mniej elektronów rozproszonych niż atomy pierwiastków ciężkich (o wysokiej liczbie atomowej  $Z$ ) [68, 79]. Rozpraszanie to może służyć do badania rozkładu liczby atomowej na powierzchni próbki oraz jest źródłem dobrego kontrastu fazowego [80]. Dodatkowo liczba elektronów wstecznie rozproszonych emitowanych z próbki zależy od kąta padania wiązki pierwotnej. Przy założeniu, iż wiązka pierwotna jest jednakowo zorientowana względem

próbki przez cały czas badania, siła odbieranego sygnału będzie zależała od nachylenia elementu powierzchni próbki względem wiązki, dzięki czemu sygnał elektronów wstecznie rozproszonych może służyć również do charakteryzacji topografii obiektu i zróżnicowaniu składu chemicznego próbek [75, 79].

Oprócz elektronów SE i BSE, próbka bombardowana wiązką pierwotną emituje także promieniowanie rentgenowskie, zarówno ciągłe jak i charakterystyczne. Jest to jeden z efektów związanych z niesprężystym rozpraszaniem elektronów o dużej energii oddziałujących z elektronami atomów badanego preparatu. Promieniowanie to powstaje, gdy elektrony padające powodują jonizację wewnętrznych powłok elektronowych tj. przemieszczenie lub wybite elektronu z powłoki bliższej jądra na dalszą. Atom w wyniku relaksacji, powracając do stanu równowagi, emituje kwant charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego lub elektron Auger'a [75, 80]. Promieniowanie to emitowane jest z głębokości do 5  $\mu\text{m}$ , a wydajność jego emisji wzrasta wraz ze zwiększaniem się liczby atomowej  $Z$ . Promieniowanie rentgenowskie charakterystyczne z kolei wykorzystywane jest w mikroanalizie rentgenowskiej EDS/EDX (ang. *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) [68, 69].

Od materiału budującego próbkę (liczby atomowej pierwiastka) oraz napięcia przyspieszającego wiązkę elektronów uzależniony jest nie tylko rodzaj sygnału emitowanego przez próbkę, ale także wielkość i kształt obszaru wzbudzenia [81]. Czym większe napięcie przyspieszające wiązkę elektronów (większa energia elektronów) tym większa głębokość, objętość oraz średnica obszaru emisji, czyli obszaru wzbudzenia. Przy czym, średnica obszaru wzbudzenia zwykle jest większa niż średnica wiązki padającej [69, 74].



Rys. 29. Schemat zależności wielkości i kształtu obszaru wzbudzenia od liczby atomowej badanego materiału i napięcia przyspieszającego wiązkę elektronów.

#### 4.4. Zastosowanie skaningowej mikroskopii elektronowej

Nowoczesne skaningowe mikroskopy elektronowe są uniwersalnymi przyrządami badawczymi o wszechstronnym zastosowaniu. Z ich pomocą możliwe jest uzyskanie obrazów powierzchni o wysokiej rozdzielczości na różnorodnych materiałach, o cechach mieszczących się w mikro- i nanometrycznym zakresie skali wielkości. Elektronowy mikroskop skaningowy, dzięki dużej głębi ostrości, pozwala na prowadzenie obserwacji powierzchni ciał stałych bez konieczności stosowania złożonych technik preparatywnych. Materiałami badanymi tą techniką mogą być m.in.:

- aerozole atmosferyczne;
- proszki;
- materiały tlenkowe;
- kryształy;
- nanorurki i grafeny;
- cienkie warstwy;
- stopy i związki międzymetaliczne.

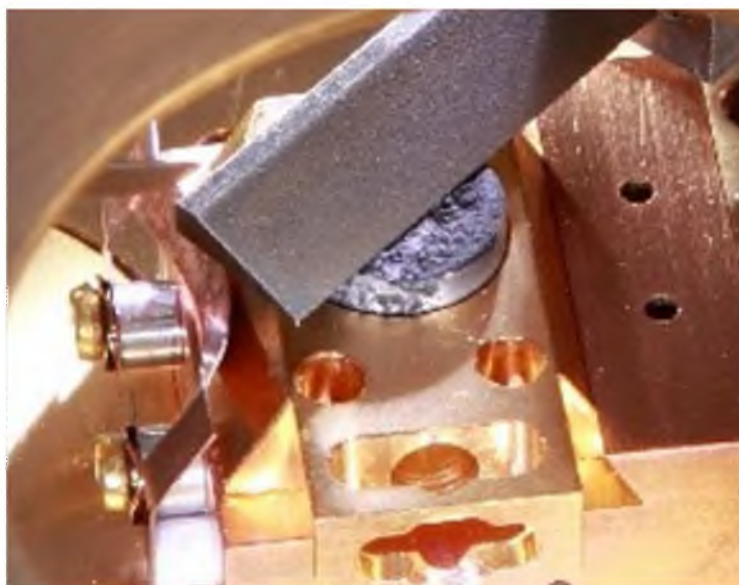
Dzięki doposażeniu mikroskopu w dodatkową nowoczesną przystawkę mrozącą Cryo-SEM możliwe jest również badanie materiałów biologicznych, w tym bakterii i tkanek roślinnych oraz zwierzęcych. Obserwacja (obrazowanie) preparatu w stanie uwodnionym nie była bowiem dotąd możliwa za pomocą techniki SEM [67].

Jedynym z wymagań wobec próbek analizowanych na skaningowym mikroskopie elektronowym jest, aby nie zawierały wilgoci, były odporne na warunki próżni, czyli miały w miarę trwałą strukturę (powierzchnię) oraz przede wszystkim były dobrym przewodnikiem elektrycznym. Dlatego też, większość próbek wymaga specjalnego przygotowania poprzez suszenie czy napyłanie warstwą przewodzącą. Próbkę spełniające te wymagania analizuje się bez specjalnego przygotowania, należy jedynie usunąć zanieczyszczenia powierzchniowe, poprzez przedmuchanie powierzchni gazem obojętnym lub poprzez kąpiel w płucze ultradźwiękowej. W przypadku próbek słabo przewodzących, ale odpornych na warunki wysokiej próżni, po przyklejeniu badanego materiału do stolika mikroskopowego, za pomocą taśmy lub krążka węglowego, naparowuje się na badany materiał cienką warstwę przewodnika (złota, węgla lub platyny) w celu uzyskania przewodnictwa [82].

Preparatyka i typ pokrycia powłoką przewodzącą zależy od natury próbki i informacji, jakie chcemy uzyskać. Próbkę słabo przewodzącą i dodatkowo uwodnioną, a więc większość



preparatów biologicznych, obrazuje się po ich uprzednim zamrożeniu w ciekłym azocie (temperatura 77K, tj.  $-196^{\circ}\text{C}$ ). Sublimuje się je następnie, aby pozbyć się niepożądanych kryształków lodu. Zamrożona próbka trafia dalej do komory przygotowawczej, gdzie przed napyleniem można próbki przeciąć specjalnym nożem, co umożliwi obserwację przekroju badanego materiału i pozyskanie o nim dodatkowych informacji [83]. Proces ten ilustruje rysunek nr 30. Pokrycie badanego materiału warstwą metaliczną platyny, przez napylenie próżniowe, ma przede wszystkim za zadanie zmniejszenie efektu tak zwanego ładowania próbki i zwiększenie możliwości oglądania jej szczegółów powierzchni [84].



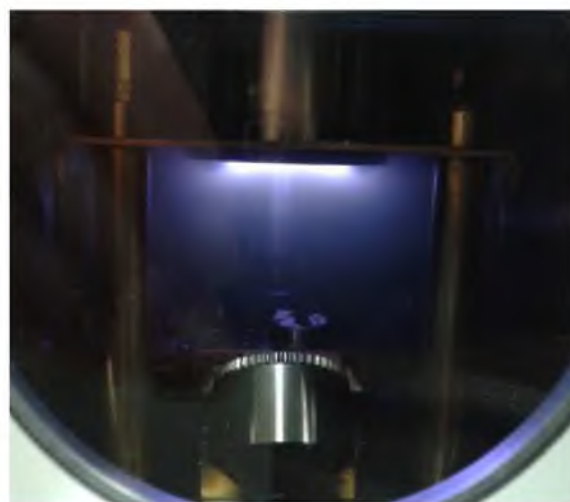
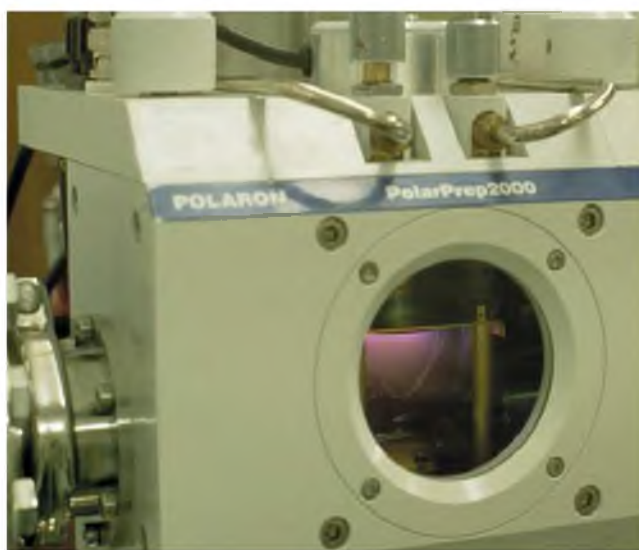
Rys. 30. Ścinanie próbki przy pomocy chłodzonego ostrza (fot. J. Płoszaj-Pyrek).

Proces zamrażania próbki w ciekłym azocie przebiega w odpowiednio szybkim tempie, który nie powoduje destrukcji materiału biologicznego, a struktura powierzchniowa bakterii nie zmienia się i zachowuje swój naturalny stan. Istotne w tej metodzie jest również to, iż niestosowane są w niej żadne mieszaniny chemiczne (krioprotektanty, gdzie najpopularniejsze to: glicerol, dimetylosulfotlenek, glikol etylenowy i propylenowy) do ochrony komórki przed uszkodzeniami. Mogłyby one spowodować na przykład: odwodnienie, ogrzanie komórek, czy wytworzenie się na lub w ich wnętrzu kryształków lodu.

Jedynym zabiegiem jaki jest stosowany, to napylenie próbek nieprzewodzących cienką warstwą metalu, która ma na celu poprawę właściwości mechanicznych obrazu i zwiększenie „Z”- liczby elektronów BSE.



Napylarka nanosi nanometryczne warstwy przewodnika (np.: węgla, srebra, złota lub platyny) na próbki wykazujące się słabym przewodnictwem elektrycznym, na grubość około 5 nm (Rys. 31). Napylone warstwy spełniają nie tylko rolę przewodnika prądu elektrycznego, ale również zabezpieczają badaną próbkę przed termicznym oddziaływaniem wiązki elektronowej [86]. Urządzenie do naporowywania cienkich warstw przewodzących umożliwia również dokładną i wiarygodną analizę chemiczną mikroanalizatorem rentgenowskim EDS [77, 85].



Rys. 31. Proces napyłania próbek platyną (fot. J. Płoszaj-Pyrek).

#### 4.5. Mikroskop JEOL JSM-7600F (FE-SEM)

Próbki do pracy zostały zbadane przy użyciu ultra-wysokorozdzielczego skaningowego mikroskopu elektronowego firmy JEOL, z działem polowym JSM-7600F (FE-SEM), który znajduje się w Laboratorium Ochrony Środowiska Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach (Rys. 32). Mikroskop ten wyposażony jest w spektrometr rentgenowski z dyspersją energii (EDS) oraz stolik mrozący Cryo-SEM, służący do pomiaru i obrazowania próbek środowiskowych [87]. Główną zaletą mikroskopu skaningowego jest wysoka rozdzielczość przy niskich napięciach (gwarantowana rozdzielczość 1.5 nm przy 1 kV lub 1.0 przy 15 kV). System mikroskopu JSM-7600F wyposażony jest również w funkcję neutralizacji ładunku elektrycznego gromadzącego się na powierzchni próbki [71].



Rys. 32. Skaningowy Mikroskop Elektronowy JEOL JSM-7600F (FE-SEM) z przystawką do badań środowiskowych Cryo-SEM (fot. J. Płoszaj-Pyrek).

Mikroskop SEM sterowany jest całkowicie cyfrowo, poprzez graficzny interfejs użytkownika. Panel operacyjny wyposażony jest w pokręta regulowane przez użytkownika, sterujące parametrami, takimi jak: ostrość, powiększenie, kontrast i jasność, czyniąc obsługę bardziej intuicyjną.

Mikroskop wyposażony jest w możliwość detekcji elektronów wtórnych SE wewnątrz soczewki obiektywu oraz pozasoczewkowy detektor SE (*Everhardta-Thornleya*). Posiada także system detekcji elektronów wstecznie rozproszonych BSE wewnątrz soczewki obiektywu i pozasoczewkowy półprzewodnikowy detektor elektronów wstecznie rozproszonych LA BSE. Detektor BSE tak skonstruowany jest patentem firmy JEOL i dzięki niemu możliwa jest detekcja czystego sygnału elektronów wstecznie rozproszonych pod małym kątem do powierzchni próbki.

Źródłem elektronów w użytym mikroskopie jest działo z termiczną emisją polową elektronów FEG (ang. *Field-Emission Gun*). Pozwala ono na uzyskanie wiązki elektronów o niewielkiej średnicy i dużej gęstości prądu emisyjnego, co nawet przy wykorzystaniu mniej skomplikowanych układów soczewek, pozwala na uzyskanie lepszej zdolności rozdzielczej mikroskopu [68, 75].

Specyfikacja techniczna wykorzystywanego urządzenia zawarta jest w tabeli nr 2.

Tabela 2. Parametry techniczne mikroskopu JEOL JSM-7600F (FE-SEM) [78].

<b>Rozdzielczość mikroskopu dla obrazów SE (detekcja elektronów wtórnych)</b>	nie gorsza niż 1,0 nm (przy napięciu przyspieszającym 15 kV)
	nie gorsza niż 1,6 nm (przy napięciu przyspieszającym 1 kV)
<b>Powiększenie obrazów mikroskopowych (dla próbki umieszczonej w eucentrycznej odległości roboczej)</b>	Minimalne: 25 x
	Maksymalne: 1 000 000 x
<b>Zakres energii elektronów przy powierzchni próbki</b>	100 eV do 30 keV (energia elektronów regulowana ze skokiem 0,1 keV lub mniejszym)
<b>Prąd wiązki elektronowej mierzony na powierzchni próbki</b>	Od 1pA do 250nA przy 20kV (płynna regulacja)
	Maksymalny prąd dla napięcia 15 kV (przy zastosowaniu przysłony obiektywowej) - nie mniejszy niż 200 nA
	Maksymalny prąd dla napięcia 30 kV (przy zastosowaniu przysłony obiektywowej): >400 nA

Specyfikacja wysokorozdzielczego skaningowego mikroskopu elektronowego z katodą polową (FE-SEM), wyposażonego w zintegrowany system analizy EDS (mikrosonda rentgenowska) oraz komorę Cryo-SEM obejmuje system optyki elektronowej, który stanowi przede wszystkim działo elektronowe typu FEG, charakteryzujące się najmniejszym rozmiarem źródła (maks. 30 nm). Składa się ono z katody z termiczną emisją polową typu Schottky'ego i emitera ZrO/W. Wymaga jedynie minimalnego justowania poprzez mechaniczne i elektromagnetyczne odchylenie. Zastosowanie tego unikalnego stożkowego działła w połączeniu z aperturą soczewki obiektywu daje całkowicie zautomatyzowaną optykę, co czyni ten system bezobsługowym [85].

Mikroskop ten posiada również eucentryczny stolik preparacyjny dla wszystkich odległości roboczych WD, gdzie osie X, Y, Z, obrót (R) i pochylenie (T) stolika preparatu w komorze roboczej są zmotoryzowane i sterowane przez komputer [71].

Mikroskop JSM-7600F wyposażony jest w automatyczny układ pompowania, sterowany i kontrolowany przez niezależny mikroprocesor komunikujący się z głównym komputerem sterującym. Komora próbki odpompowywana jest pompą turbomolekularną (TMP-270 1/s), komora działła pompą jonową (IP-1) 60 1/s, natomiast komora pośrednia

pompą (IP-2) 20 l/s. W skład systemu próżniowego wchodzi również: pompa rotacyjna, wbudowana pułapka antykontaminacyjna w komorze próbki, chłodzona ciekłym azotem, służąca próżniowa do wprowadzania próbek [71, 79].

Mikroskop zintegrowany jest z systemem komputerowym, gdzie sterowanie pracą mikroskopu odbywa się poprzez graficzny interfejs użytkownika GUI (ang. *Graphical User Interface*), uruchamiany w systemie operacyjnym Microsoft Windows XP. Wszelkie działania, począwszy od ustawiania parametrów do zapisu obrazów końcowych wykonywane są przy użyciu myszy i klawiatury lub za pośrednictwem panelu operacyjnego do manualnego sterowania podstawowymi funkcjami mikroskopu.



Rys. 33. Graficzny interfejs użytkownika (GUI) do obserwacji i nawigacji (fot. J. Płoszaj-Pyrek).

Mikroskop jest wyposażony, także w spektrometr rentgenowski z dyspersją energii EDS (ang. *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*), który analizuje charakterystyczne promieniowanie rentgenowskie wzbudzone na skutek skanowania wiązką elektronów. W urządzeniu tym energia poszczególnych powstałych fotonów promieniowania rentgenowskiego wytwarza ładunek prądowy w detektorze półprzewodnikowym, gdzie następnie jest on przetwarzany do impulsu napięciowego, a ostatecznie do sygnału cyfrowego. Energia takiego promieniowania rentgenowskiego jest proporcjonalna do amplitudy impulsu napięciowego. Powstające sygnały cyfrowe są selekcjonowane pod względem energii w analizatorze wielokanałowym. Każdy docierający sygnał cyfrowy jest dodawany, jako pojedynczy impuls do odpowiedniego pod względem energii kanału [69]. Tym samym w pojawiającym się spektrum(widmie) wyświetlane są piki, które stanowią sumę

poszczególnych impulsów. Dzięki temu spektroskopia EDS pozwala przeprowadzić zarówno analizę jakościową jak i ilościową badanego preparatu, jak również zbadanie rozkładu wybranych pierwiastków na zadanym obszarze tzn. tworzenie map atomowych (*mapping*), tworzenie widm rentgenowskich z wybranego obszaru, punktu bądź wzdłuż dowolnie poprowadzonej linii skanowania oraz zbieranie pełnego widma dla każdego piksela zadanego obszaru [80].

Do mikroanalizy EDS stosowany jest system INCA Energy 250, który umożliwia przeprowadzenie analizy jakościowej i ilościowej z obszaru na próbce pobudzonego wiązką elektronową, uzyskiwanie map pierwiastków i rozkładów liniowych oraz otrzymanie obrazów cyfrowych i ich wydruk. Możliwe jest również powtórne przeglądanie danych w celu utworzenia map i analiz liniowych dla nowych pierwiastków, a także tworzenie raportów wykorzystaniem dostępnego zbioru szablonów. Zapis obrazów natomiast możliwy jest w trzech formatach: TIFF, JPEG i BMP, a także w trzech rozdzielczościach (1280 x 960, 2560 x 1920 lub 5120 x 3840 pikseli), jak również w skali szarości lub poprzez funkcje nadawania pseudo kolorów (z palety kolorów systemu Windows) dla wyznaczonych pierwiastków [78].

#### 4.5.1. Przystawka "Cryo-SEM"

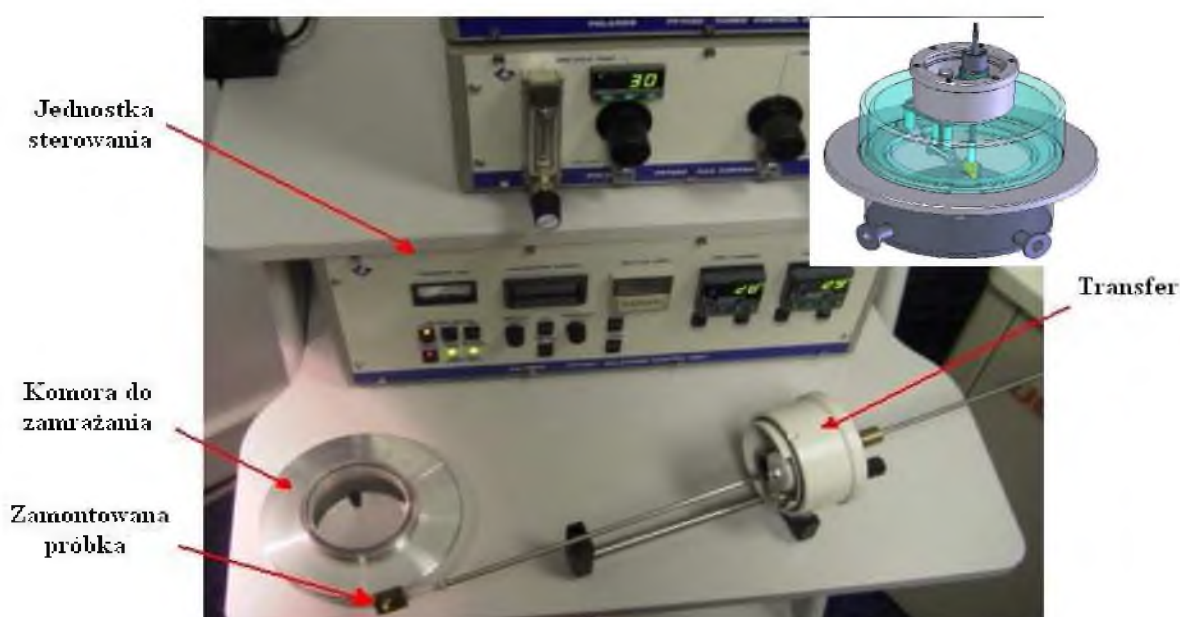
Mikroskop JSM-7600F stosowany do badań wyposażony jest dodatkowo w przystawkę „Cryo-SEM”, służącą do pomiaru próbek środowiskowych. Urządzenie to umożliwia preparowanie in-situ, transfer do komory mikroskopu oraz badanie w stanie zamrożonym próbek zawierających wodę lub inne ciecze, próbek ciekłych oraz próbek podatnych na zniszczenia radiacyjne pod wiązką elektronową, niestabilnych lub łatwo kontaminujących, a w szczególności zamrożonych tkanek roślinnych, zwierzęcych oraz bakterii [88].

Stolik Cryo-SEM składa się z kilku elementów niezbędnych do prowadzenia wysokorozdzielczych badań mikroskopowych w temperaturach kriogenicznych, są to:

- stanowisko do wstępnego zamrażania próbek,
- przyrząd do przenoszenia wstępnie zamrożonych próbek bez kontaktu z powietrzem (tzw. transfer),
- własną komorę preparacyjną ze stolikiem do montażu próbek podłączoną do właściwej komory mikroskopu,
- jednostkę sterowania przebiegiem procesów.



Stanowisko do szybkiego zamrażania próbek zawiera komorę próżniową, podłączoną do pompy rotacyjnej oraz pojemnik wypełniony ciekłym azotem, którego temperatura wynosi  $-196^{\circ}\text{C}$  (Rys. 34). Do komory tej następnie przykładą się transfer z zamontowanym materiałem do badań. Pompa pozwala na szybkie wytworzenie próżni wewnątrz komory, a zanurzenie próbki w ciekłym azocie z kolei prowadzi do jej nagłego zamrożenia, bez jej uszkodzenia. Następnie próbka jest zamykana w urządzeniu transferującym i przenoszona na stolik preparacyjny. Taki sposób zamrażania próbek biologicznych pozwala na zachowanie wszelkich ich właściwości (np. kształtu), tym samym, umożliwiając ich obserwację w formie jak najbardziej zbliżonej do naturalnej.



Rys. 34. Stanowisko do wstępnego zamrażania próbek Cryo-SEM oraz transfer (fot. J. Płoszaj-Pyrek, schemat Quorum Technologies).

Urządzenie służące do przenoszenia próbek Cryo-SEM, tzw. transfer jest przenośną, szczelną komorą, we wnętrzu której na specjalnym pręcie umieszcza się aluminiowy uchwyt, służący do mocowania próbki (Rys. 35). Urządzenie to szczelnie łączymy ze stanowiskiem do zamrażania próbek, które po zanurzeniu w ciekłym azocie zamykamy w transferze, skutecznie odizolowując od środowiska zewnętrznego. Pozwala on następnie na przeniesienie materiału do komory preparacyjnej na stolik chłodzący, zamontowany w komorze mikroskopu, bez konieczności zapowietrzania obu komór. Wyposażona jest ona we własny układ próżniowy, zawierający pompę turbomolekularną oraz układ tłumienia drgań.

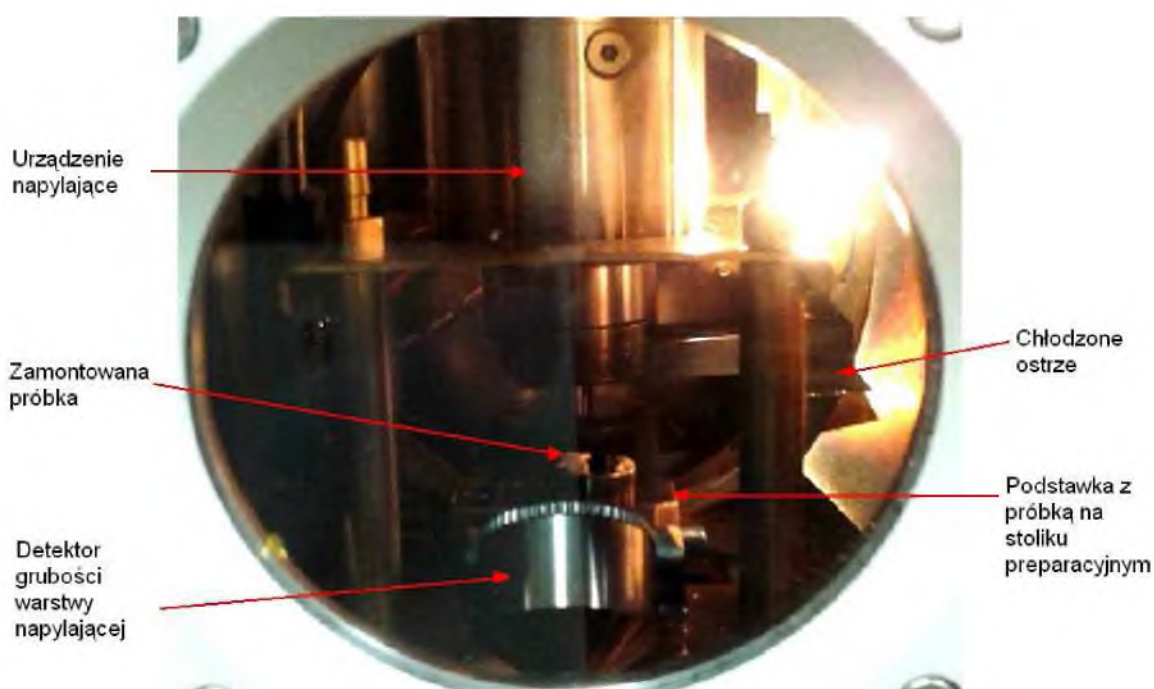


Rys. 35. Urządzenie do przenoszenia próbek Cryo-SEM (fot. Quorum Technologies).

Komora preparacyjna przystawki Cryo-SEM umożliwia przeprowadzanie in-situ (pod próżnią) i w sposób kontrolowany następujących czynności:

- sublimację, czyli usuwanie lodu z powierzchni próbki,
- wykonywanie świeżych przełamów zamrożonych próbek przy użyciu chłodzonego ostrza z przesuwem mikrometrycznym,
- naparowanie cienkich warstw przewodzącymi metalami szlachetnymi.

Komora ta posiada duże okno wglądowe na stolik do montażu próbek, wraz z oświetleniem, co ułatwia wykonywanie wszystkich procesów prowadzących do przygotowania próbki do badania pod mikroskopem SEM (Rys. 36). Możliwa jest w niej również kontrola temperatury w zakresie od  $-185^{\circ}\text{C}$  do co najmniej  $+50^{\circ}\text{C}$ .



Rys. 36. Elementy komory preparacyjnej Cryo-SEM (fot. J. Płoszaj-Pyrek).

## 5. Cel pracy i zakres badań

Celem pracy było zbadanie mikrostruktury oraz składu chemicznego powierzchniowej warstwy bakterii. Badania dotyczyły drobnoustrojów będących składnikami aerozoli powietrza pobranych w gabinetach dentystycznych oraz w oczyszczalniach ścieków. Stanowiły one część projektu dotyczącego narażenia na aerozol bakteryjny populacji w województwie śląskim, prowadzonym we współpracy Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego z Katedrą Ochrony Powietrza na Wydziale Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej w Gliwicach.

Kolejnym etapem pracy było określenie wpływu temperatury i pH środowiska na morfologię i skład chemiczny powierzchniowych warstw komórek bakterii. Tą część pracy prowadzono na bakteriach *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* pochodzących z kolekcji Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, które hodowano w różnych warunkach temperaturowych i na podłożach o różnych wartościach pH.

W trakcie realizacji projektu analizowano wybrane cechy morfologiczne oraz przeprowadzono identyfikację jakościową i ilościową pierwiastków powierzchni wyizolowanych bakterii za pomocą metod fizycznych, takich jak: spektrometr fotoelektronów wzbudzonych promieniami rentgenowskimi XPS i skaningowy mikroskop elektronowy SEM z przystawką mrozącą Cryo.

### 5.1. Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły bakterie wchodzące w skład bioaerozoli pobranych w gabinetach dentystycznych i przy oczyszczalni ścieków oraz pochodzące z kolekcji bakterie *B. subtilis* i *E. coli* inkubowane w warunkach laboratoryjnych, w różnych temperaturach i na podłożach o różnym pH.

Podstawowe pomiary przeprowadzono przy użyciu Wielofunkcyjnego Spektrometru Elektronów PHI 5700/660 firmy Physical Electronics. Na podstawie wykonanych pomiarów i uzyskanych widm przeglądowych XPS obliczono koncentrację atomową pierwiastków występujących na powierzchni przebadanych próbek. Przy interpretacji wyników skoncentrowano się przede wszystkim na wyznaczeniu pierwiastków głównych i pobocznych, a jako wartość graniczną przyjęto 1%.



## 5.2. Pobór próbek powietrza

Bioaerozole do badań pobierano w dwóch gabinetach dentystycznych znajdujących się na terenie Wrocławia i Bytomia. Próbkę bakterii pobierano w lutym 2010 roku za pomocą jednostopniowego impaktora air *IDEAL*®3P firmy bioMerieux (Rys. 37). Zasada poboru w tym urządzeniu opiera się na skierowaniu ściśle określonej objętości powietrza na płytkę agarową umieszczoną w impaktorze.



Rys. 37. Impaktor airIDEAL®3P firmy bioMerieux do poboru próbek (fot. J. Płoszaj-Pyrek).

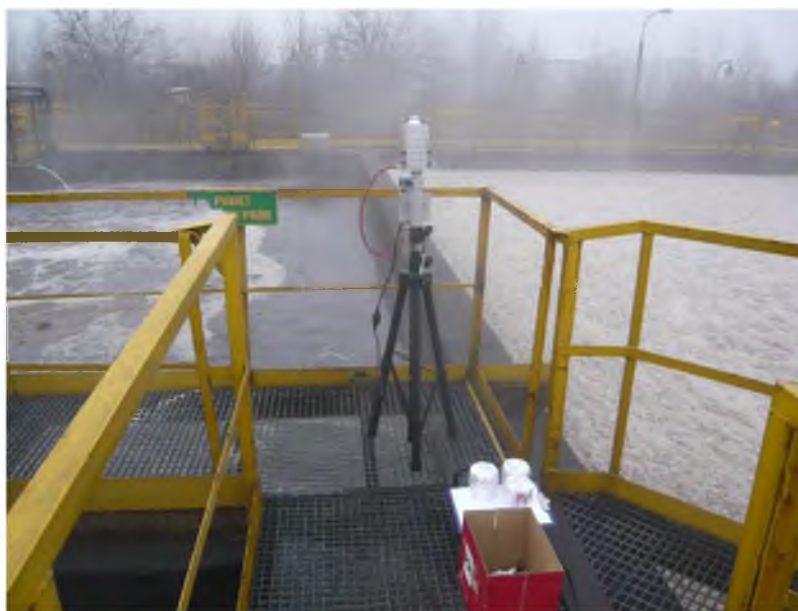
Do wychwytu bakterii heterotroficznych znajdujących się w pobranym powietrzu wykorzystano podłoża agarowe tryptozowo-sojowe TSA (*Tryptic Soy Agar*) o składzie:

- |                         |                   |
|-------------------------|-------------------|
| • pepton z kazeiny      | 17 g              |
| • pepton sojowy         | 3 g               |
| • chlorek sodu          | 5 g               |
| • fosforan dwupotasowy  | 2,5 g             |
| • dekstroza             | 2,5 g             |
| • agar                  | 20 g              |
| • woda demineralizowana | 1 dm <sup>3</sup> |
| • pH 7,3                |                   |

Do izolacji bakterii o wysokich wymaganiach odżywczych wykorzystano TSA wzbogacone odwołknioną krwią baranią (5%). Podłoża te następnie inkubowano w temperaturze 22°C przez okres 7 dni. Wyizolowane bakterie w dalszej kolejności oznaczono do gatunku przy pomocy mikrotestów biochemicznych API.

### 5.3. Mikroorganizmy z oczyszczalni ścieków

Materiał do badań pobierano na terenie oczyszczalni ścieków znajdujących się na obszarze Śląska. Pobór miał miejsce w listopadzie 2010 roku i obejmował kilka obiektów: dwie oczyszczalnie komunalne, dwie oczyszczalnie ścieków fenolowych (koksowniczych) oraz jedną oczyszczalnię ścieków w zakładzie uboju drobiu. Wszystkie z nich realizowały proces biologicznego oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego, przy czym w oczyszczalniach ścieków komunalnych występowała dodatkowo część mechaniczna do usuwania zanieczyszczeń mineralnych. Punkty pomiarowe zlokalizowane były na podestach w pobliżu komór napowietrzania osadu. Wysokość punktu pomiarowego we wszystkich miejscach była niezmienna i wynosiła 1,5 m liczonej względem podestu. Przeciętna różnica podestu względem lustra ścieków natomiast wynosiła na badanych oczyszczalniach ok. 0,8 m.



Rys. 38. Fotografia przykładowego stanowiska pomiarowego (fot. J. Wolany).

Próby powietrza pobierano za pomocą 6-cio stopniowego impaktora Andersena (Rys. 39), w którym zasada separacji bakterii polega na wytrącaniu ze strugi przepływającego

powietrza, pod wpływem występowania sił bezwładności, zasysanych cząstek ze znanej objętości powietrza (tzw. metoda zderzeniowa). Za pomocą impakcji inercyjnej następowało przeniesienie mikroorganizmów z powietrza na powierzchnię szalek Petriego, zawierających podłoże hodowlane. Każdy z sześciu segmentów (stopni) posiada po 400 dysz w postaci otworków o malejącej średnicy (największe otwory znajdują się w segmencie wlotowym, a najmniejsze w segmencie wylotowym).



Rys. 39. Widok ogólny i schemat budowy impaktora Andersena [89].

Szalki Petriego w liczbie 18 sztuk z podłożem agarowym, na których osadzone zostały cząstki bakterii inkubowano przez okres 7 dni w temperaturze pokojowej. Następnie wyrosłe kolonie poddano analizie makroskopowej i mikroskopowej. Analiza makroskopowa obejmowała określenie cech morfologicznych kolonii, z kolei analiza mikroskopowa opierała się na obserwacji preparatów barwionych metodą Grama i dostarczała danych na temat wielkości komórek, ich kształtu, ułożenia komórek względem siebie, czy występowania przetrwalników. Badane bakterie identyfikowano następnie do gatunku na podstawie ich własności metabolicznych, przy pomocy testów biochemicznych API. Badania te przeprowadzono w Instytucie Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego w Sosnowcu za pomocą komputerowego systemu analizy APIweb (bioMérieux, Francja).

#### 5.4. Wpływ temperatury i pH na skład powierzchniowych warstw badanych bakterii

Do oceny wpływu temperatury i pH na skład powierzchni komórek bakterii wykorzystano mikroorganizmy *E. coli* i *B. subtilis*, pochodzące z kolekcji Katedry

Mikrobiologii UŚ. W celu przygotowania inokulum bakterie hodowano na podłożu bulion odżywczy o składzie:

- wyciąg mięsny (Bacto-Beef Extrsct, Difco) 3g
- pepton (Becto-Peptide, Difco) 5g
- agar (Difco) 20g
- woda destylowana 1 000 ml
- pH 7

Metodą płytek tartych 0,1 ml 18- godzinnej hodowli bakterie posiewano na podłoża z agarem odżywczym. Posiane w ten sposób płytki inkubowano w temperaturze 20°C i 37°C, przez okres 24 godzin. Przygotowane inokulum *B. subtilis* posiewano również na agar odżywczy o pH równym 5 i 9.

## **6. Warunki eksperymentalne**

### **6.1. Preparatyka próbek do pomiarów XPS i Cryo-SEM**

Istotną i bardzo odpowiedzialną częścią badań było przygotowanie analizowanego materiału. Wszystkie oznaczone i badane próbki w pracy miały postać hodowli bakterii na pożywce agarowej i wymagały krótkotrwałej preparatyki.

#### **6.1.1. Sposób przygotowania materiału do pomiarów XPS**

W przypadku spektrometru fotoelektronów XPS analizowane mogą być wyłącznie próbki stałe, czyli stabilne w warunkach próżniowych. Uzyskane z hodowli na pożywce bakterie pobierano bezpośrednio z powierzchni szalki Petriego, za pomocą wysterylizowanego w etanolu skalpela. Materiał biologiczny, w niewielkiej ilości, наносono na przygotowany dwustronnie przylepny płatek węglowy, który wcześniej został przyklejony do wyczyszczonego stolika transportującego. Umieszczano go następnie w specjalnym uchwycie i wprowadzano do komory wstępnej, w której próbka zostaje odpompowana, nie jest, bowiem możliwe bezpośrednie przejście z warunków atmosferycznych do wysokopróżniowych (Rys. 40). Komora wstępna (załadowcza) wyposażona jest we własny system pomp, umożliwiający odpompowywanie gazów atmosferycznych oraz wilgoci, aby pozbyć się jak największej ilości wody z uwodnionych bakterii. Próbkę uwalniającą wodę lub inne związki lotne wymagają dłuższego czasu pompowania, nawet ponad 1 godz. Próbkę za pomocą systemu transferu przemieszczano dalej do komory głównej spektrometru. W komorze tej ustalano położenie preparatu w ognisku wszystkich wiązek (kamera optyczna, analizator, lampa rentgenowska). Padające fotony promieniowania rentgenowskiego powodują выбicie elektronów, przy czym niejednorodność rozkładu ładunku prowadzi do przesunięcia, zniekształcenia i poszerzenia linii fotoelektronów. W takim przypadku ładunek należało skompensować strumieniem powolnych elektronów z działu neutralizującego. To powodowało następnie pomiar przy skorygowanych wartościach energii wiązania linii fotoelektrycznych. Warunki ultra niskiego ciśnienia panujące w komorze zapobiegały natomiast rozproszeniu elektronów i sprawiały, że po wybiciu z próbki zmierzały one prosto do analizatora energii. Wyselekcjonowane przez analizator elektrony trafiały następnie do powielacza, który odpowiadał za wzmocnienie sygnału. Otrzymane w ten sposób dane

przesyłane były do komputera pełniącego rolę układu rejestrującego i przedstawiane w postaci widm XPS. Wszystkie widma rejestrowane były w temperaturze otoczenia.



Rys. 40. Uchwyt pomiarowy z próbkami bakterii na płatkach węglowych (fot. J. Płoszaj-Pyrek).

### 6.1.2. Sposób przygotowania materiału do pomiarów Cryo-SEM

Specyficzny charakter naturalnie uwodnionego materiału biologicznego, zwłaszcza tak małych i delikatnych mikroorganizmów jak bakterie, wymaga szczególnej troski o prawidłowy przebieg każdego z etapów doświadczenia. Wysokie prawdopodobieństwo powstawania artefaktów, począwszy od procesu izolacji, przez utrwalanie i inne procedury odpowiednie dla danej techniki, utrudnia, a często wręcz uniemożliwia prawidłową interpretację uzyskanych obrazów. Standardowe, skomplikowane metody przygotowania obiektu badawczego do SEM bywały bardzo uciążliwe i czasochłonne, co często stanowiło jedną z największych wad mikroskopii elektronowej, dlatego też naukowcy coraz częściej sięgają do metod o wiele mniej absorbujących czas. Przykładem jednej z takich metod przygotowania preparatów biologicznych jest zastosowanie przystawki mrozącej Cryo-SEM, dzięki której możliwe jest badanie naturalnie uwodnionych próbek biologicznych. Technika ta z funkcją mrożenia jest stosunkowo nowym narzędziem do badania w pełni uwodnionych próbek środowiskowych. Umożliwia ona wizualizację materiału w stanie jak najbardziej zbliżonym do naturalnego. Bardzo ważne jest tutaj szybkie obniżenie temperatury próbki, gdyż podczas powolnego mrożenia delikatna i silnie uwodniona struktura biologiczna ulega znacznym zmianom, a obraz tym samym bogaty jest w liczne artefakty. Należy pamiętać, iż zamrożona tkanka jest bardzo delikatna i łatwo o jej zniszczenie. Istotne są również



umiejętności operatora mikroskopu, ponieważ to one w dużej mierze są podstawowym czynnikiem determinującym jakość otrzymanych wyników.

Próbka przeznaczona do badania metodami mikroskopii skaningowej powinna mieć możliwie małą objętość. Wymiary jej zależą przede wszystkim od konstrukcji komory użytego mikroskopu, przy czym możliwe jest również umieszczenie na stoliku więcej niż jednej próbki.

Zawsze próbki, aby nie zsunęły się z aluminiowej podstawki podczas zamrażania i innych czynności przygotowawczych do pomiaru w kolumnie mikroskopu, przymocowywano przy pomocy krążków węglowych lub pasty węglowej. Węgiel zawarty w takiej paście lub krążku tworzył warstwę przewodzącą zapewniającą odprowadzenie ładunków elektrycznych z próbki.



Rys. 41. Różne typy podstawek próbki (fot. Quorum Technologies).



Rys. 42. Uchwyt z próbkami na podstawce (fot. J. Płoszaj-Pyrek).

W przypadku badanych próbek biologicznych przygotowanie do pomiaru różni się znacznie od próbek nieuwodnionych. Najważniejsze jest, aby były one w szybki sposób zamrożone. Żeby tego dokonać umieszczano materiał biologiczny bezpośrednio z szalki Petriego za pomocą sterylnych narzędzi (skalpel) na specjalnej podstawce (Rys. 41), przy pomocy wcześniej przygotowanej pasty węglowej. Składa się ona z koloidalnego grafitu oraz agaru Tissue Tek, czyli metylocelulozy odpornej na niskie temperatury. Oba te składniki mieszano w proporcji 3:1. Następnie aluminiową podstawkę z przyklejoną próbką montowano na uchwyt urządzenia transferowego i zamrażano w komorze szybkiego mrożenia z ciekłym azotem ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) w warunkach próżni. Pozwala to na zachowanie naturalnych właściwości badanego materiału. Dalej zmrożony materiał przenoszono do komory preparacyjnej przystawki Cryo-SEM, bez zapowietrzania obu komór.

W komorze tej próbkę ścinano schłodzonym ostrzem, sublimowano przez okres 10 minut do temperatury  $-70^{\circ}\text{C}$ , aby pozbyć się ewentualnych kryształków lodu. Temperatura ta, nie powoduje uszkodzenia materiału biologicznego. W dalszym etapie wraca się do temperatury pracy mikroskopu, czyli  $-130^{\circ}\text{C}$ . Tak przygotowane próbki napyłano cienką warstwą platyny (5-10 nm), w celu uniknięcia niekorzystnych efektów związanych ze skondensowaną wiązką elektronów w komorze próżniowej. W dalszej kolejności próbki umieszczano w komorze pomiarowej mikroskopu i poddawano szczegółowemu badaniu. Zdjęcia oglądanych preparatów wykonywano przy powiększeniach od  $\times 1\,000$  do nawet  $\times 80\,000$  i napięciu przyspieszającym od  $3.0 \div 15.0\text{ kV}$ . Do wykonania wszystkich mikrofotografii bakterii wykorzystano sygnał elektronów wtórnych oraz cyfrowy system rejestracji obrazu.

Bardzo istotne przy pracy z tak delikatnym materiałem, jakim są bakterie, było wstępne opracowanie, metodą prób i błędów, właściwych parametrów optymalnej pracy w zależności od badanego gatunku bakterii. Dlatego postanowiono sprawdzić, jak zmienia się struktura powierzchni bakterii pod wpływem czasu i w zależności od sposobu przygotowywania próbek do analizy w mikroskopie. Warunki obserwacji i rejestracji obrazu badanego materiału biologicznego każdorazowo ustalano doświadczalnie ze względu na fakt, iż materiał ten jest bardzo niestabilny. Wpływ na to miała między innymi ich heterogeniczna struktura, stopień uwodnienia i przede wszystkim ich skład chemiczny. Właściwy obraz uzyskiwano dopiero dzięki odpowiedniemu czasowi ich sublimacji, grubości napyłania warstwy przewodnika, czy też zastosowanego powiększenia. Wszystko to z biegiem czasu i w trakcie badań było doświadczalnie weryfikowane, w celu uzyskania jak najlepszej jakości obrazów.



## 7. Wyniki

### 7.1. Analiza bakterii pobranych w gabinetach stomatologicznych

Z próbek powietrza pobranego w gabinetach dentystycznych wyizolowano nieprzetrwalnikujące laseczki Gram-dodatnie: *Cellulomonas*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, Gram-dodatnie laseczki przetrwalnikujące z gatunku *Bacillus*, pałeczki Gram-ujemne *Brevundimonas vesicularis* oraz bakterie z grupy ziarniaków Gram-dodatnich, z rodzaju *Staphylococcus*. Te ostatnie stanowiły najliczniej reprezentowaną grupę, dlatego też wybrano je do dalszych badań i wykonano szczegółowe analizy zawartości pierwiastków w ścianach komórkowych trzech wybranych gatunków bakterii, były to: *Staphylococcus sciuri*, *S. equorum* i *Staphylococcus* sp.

Procentowy udział pierwiastków w ścianach komórkowych badanych bakterii przedstawiono w tabeli nr 3.

Tabela 3. Koncentracja atomowa pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowych struktur bakterii *S. sciuri*, *S. equorum* i *Staphylococcus* sp. określona metodą XPS. Podane stężenia atomowe (w %) są wartościami średnimi.

Udział procentowy pierwiastków [% at.]												
Gatunki bakterii	C1s	O1s	N1s	Na1s	P2p	Si2p	Cl2p	S2p	Fe2p3	Mg2s	Al2p	Ca2p3
<i>Staphylococcus sciuri</i>	67,16	21,72	8,06	0,63	1,05	0,73	0,18	0,24	0,01	0,12	0,07	0,04
<i>Staphylococcus equorum</i>	66,25	20,92	11,21	0,46	0,56	0,13	0,09	0,13	0,02	0,16	0,04	0,03
<i>Staphylococcus</i> sp.	72,87	19,92	5,44	0,70	0,86	0,02	0,04	0,02	0,03	0,03	0,05	0,02

Przeprowadzone analizy pozwoliły na wyznaczenie dwunastu pierwiastków wchodzących w skład ściany komórkowej bakterii z rodzaju *Staphylococcus* oraz na uzyskanie ich zawartości procentowych. Wśród wykrytych pierwiastków wyróżniono pierwiastki główne, z których składają się wszystkie badane drobnoustroje, był to węgiel, tlen oraz azot. Udział węgla zmieniał się w procentach atomowych od ok. ~66-73%, tlenu od ~19-22% oraz azotu od ~5-12%. Pozostałe pierwiastki, które stanowiły zaledwie ~2% składu próbki należą do tzw. pierwiastków akcesorycznych, a ich ilość zwykle nie przekraczała 1% atomowego.

Analiza wyników XPS wykazała, iż badane bakterie różniły się między sobą zawartością pierwiastków głównych, czyli C1s, O1s i N1s. Najwyższy udział węgla występował w bakterii *Staphylococcus* sp. i stanowił 72,87% wszystkich wykrytych pierwiastków, natomiast u *S. equorum* wynosił on 66,25%. W przypadku tlenu największa jego ilość znajdowała się u bakterii *S. sciuri* (21,72%). Z kolei, najwięcej azotu znajdowało się w bakterii *S. equorum* (11,21%). Poza tym, w badanych strukturach powierzchniowych wykryto takie pierwiastki jak: sód, fosfor, krzem, chlor, siarkę, magnez i glin oraz w bardzo niewielkich ilościach wapń i żelazo. Udziały procentowe poszczególnych pierwiastków, które zaliczono do pierwiastków akcesorycznych, we wszystkich analizowanych gatunkach bakterii, różniły się od siebie w niewielkim stopniu. Różnice te zwykle nie przekraczały 0,10% atomowych, jedynie w przypadku krzemu (Si2p) różnica w jego zawartości w *S. sciuri* była dość znaczna w stosunku do pozostałych dwóch gatunków bakterii.

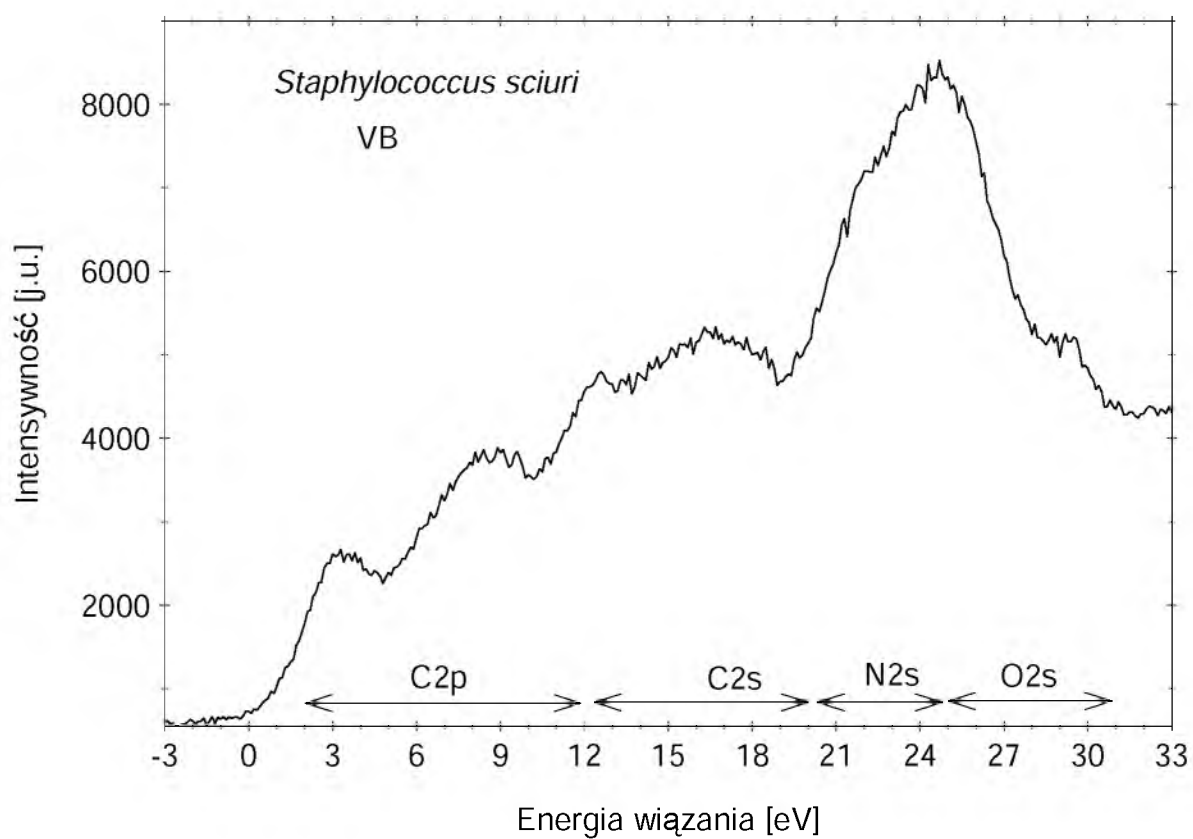
Na podstawie wyznaczonego procentowego udziału pierwiastków w badanych bakteriach obliczono proporcje koncentracji atomowych O1s/C1s, N1s/C1s oraz P2p/C1s w celu oszacowania ich struktury chemicznej. Ich zestawienie zawiera tabela numer 4. O ile stosunki O/C i N/C w bakteriach *S. sciuri* i *S. equorum* są podobne, to w bakteriach z gatunku *Staphylococcus* sp. wskaźniki te zmniejszyły się. Istotny jest również spadek o połowę wskaźnika koncentracji P/C w bakterii *S. equorum* w porównaniu do *S. sciuri*.

Tabela 4. Proporcje koncentracji atomowych wybranych pierwiastków wchodzących w skład badanego materiału.

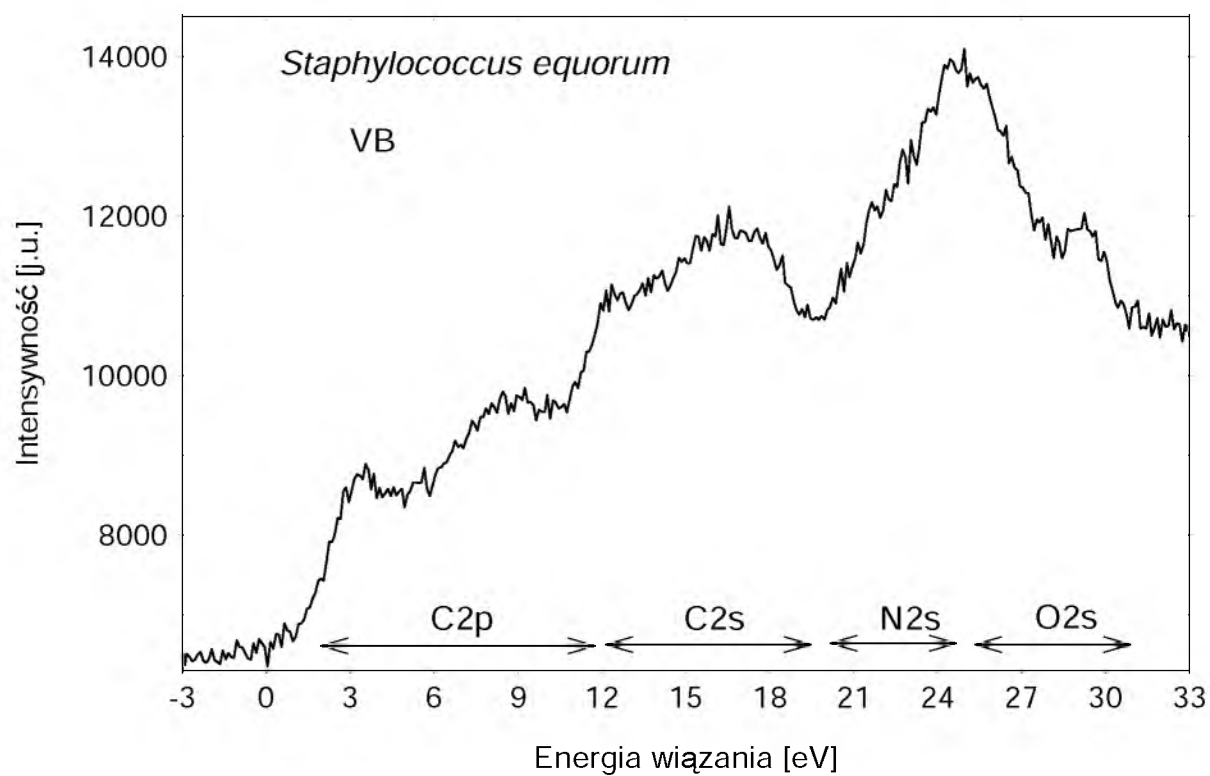
Gatunek bakterii	O/C	N/C	P/C
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0,323	0,120	0,016
<i>Staphylococcus equorum</i>	0,316	0,169	0,008
<i>Staphylococcus</i> sp.	0,273	0,075	0,012

Zmierzono, również pasma walencyjne (pasma podstawowe) w zakresie energii wiązania od -3 do 33 eV dla badanych biopolimerów. Cechą charakterystyczną wszystkich widm było występowanie kilku szerokich gęstości spektralnych w paśmie walencyjnym. Składały się one ze stanów elektronowych węgla 2p i 2s, azotu 2s oraz tlenu 2s, który ma największy udział przy energii wiązania powyżej 25 eV. Dla uwidocznienia różnic w pasmach walencyjnych zestawiono je na rysunku 43.

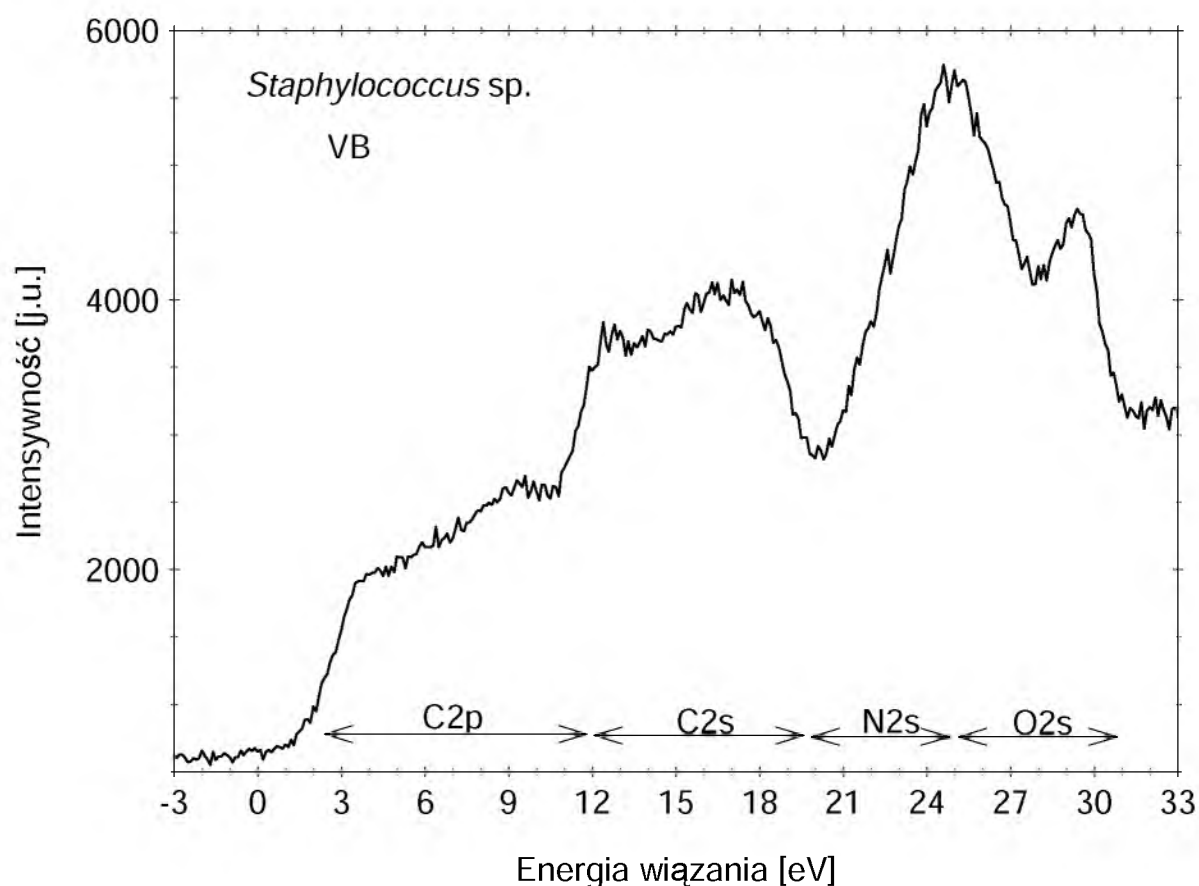
a)



b)



c)



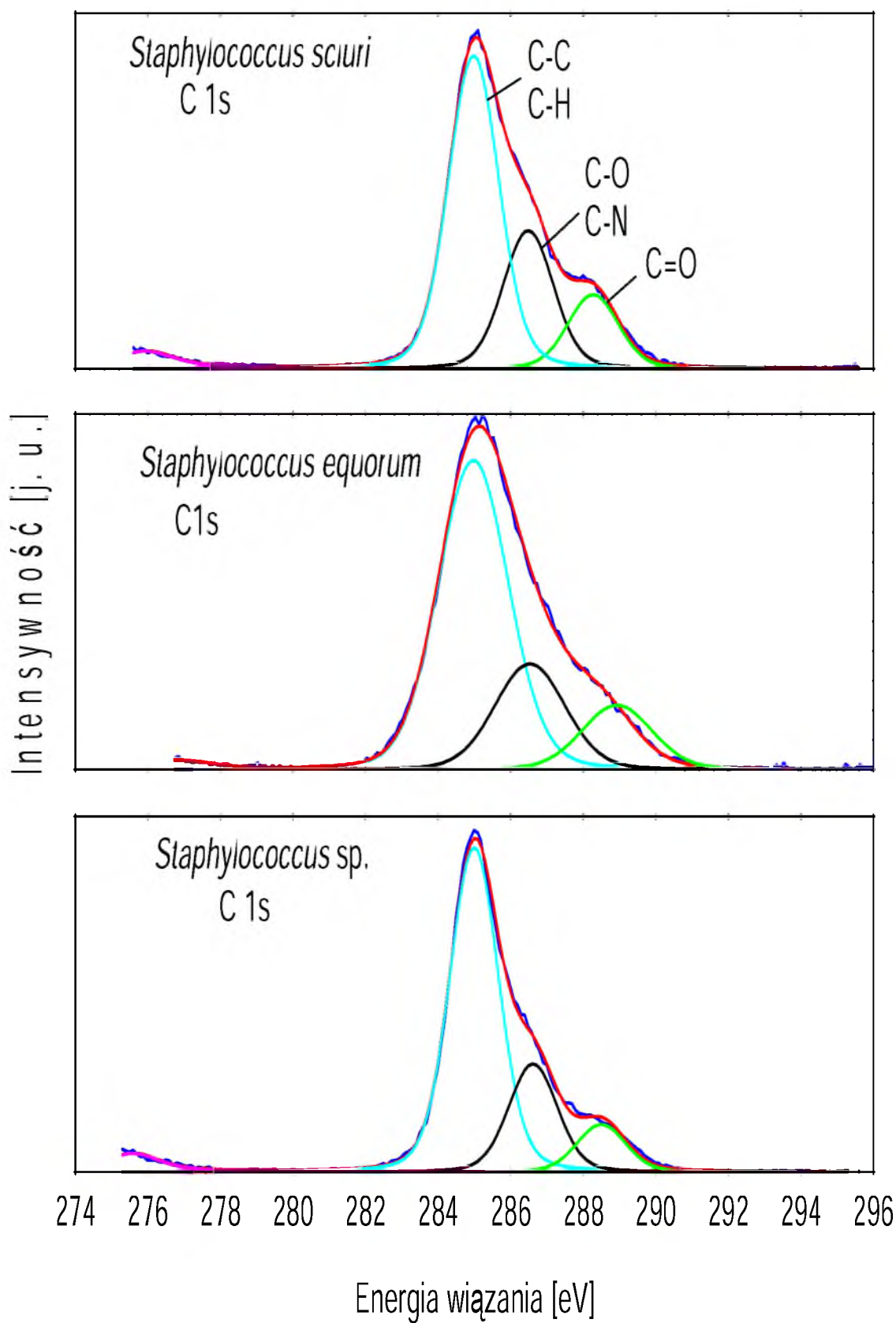
Rys. 43. Zestawienie pasm walencyjnych (VB) dla bakterii: a) *Staphylococcus sciuri*, b) *Staphylococcus equorum*, c) *Staphylococcus sp.*

W oparciu o pomiary XPS, uzyskano widma wysokiej rozdzielczości dotyczące trzech głównych pierwiastków, których linie charakteryzowały się największą intensywnością, dla wszystkich przebadanych próbek pochodzących z gabinetów dentystycznych. Używając następnie programu *Simpeak* dokonano dopasowania liniami syntetycznymi linii węgla (C1s), tlenu (O1s) i azotu (N1s). Wrażliwość tych atomów na otoczenie chemiczne, pozwoliło następnie na analizę rodzaju wiązań chemicznych występujących na powierzchni badanych próbek. Analiza uzyskanych widm pozwoliła na stwierdzenie czy mamy do czynienia z linią pojedynczą pasma podstawowego danego pierwiastka, czy też złożoną z kilku składowych. Rozszczepienie świadczyło o występowaniu tego pierwiastka w różnych połączeniach chemicznych. Dowodziła o tym ich szerokość, która nie dała się przybliżyć jednym profilem. Dzięki temu uzyskano dokładne dane dotyczące energii wiązania maksymalnego położenia pików i wartości przesunięcia chemicznego. Znajomość tych informacji, w oparciu o dane uzyskane z publikacji naukowych dotyczących analiz XPS

różnych związków chemicznych oraz katalogów widm i odpowiednich baz danych, przeprowadzono identyfikację stanów chemicznych reprezentowanych przez poszczególne linie syntetyczne. Dopasowanie pozwoliło następnie rozróżnić atomy tego samego pierwiastka tworzące różne wiązania chemiczne, co ułatwiło określenie grup funkcyjnych wchodzących w skład związków chemicznych budujących ściany komórkowe bakterii z rodzaju *Staphylococcus* oraz obliczenie ich intensywności.

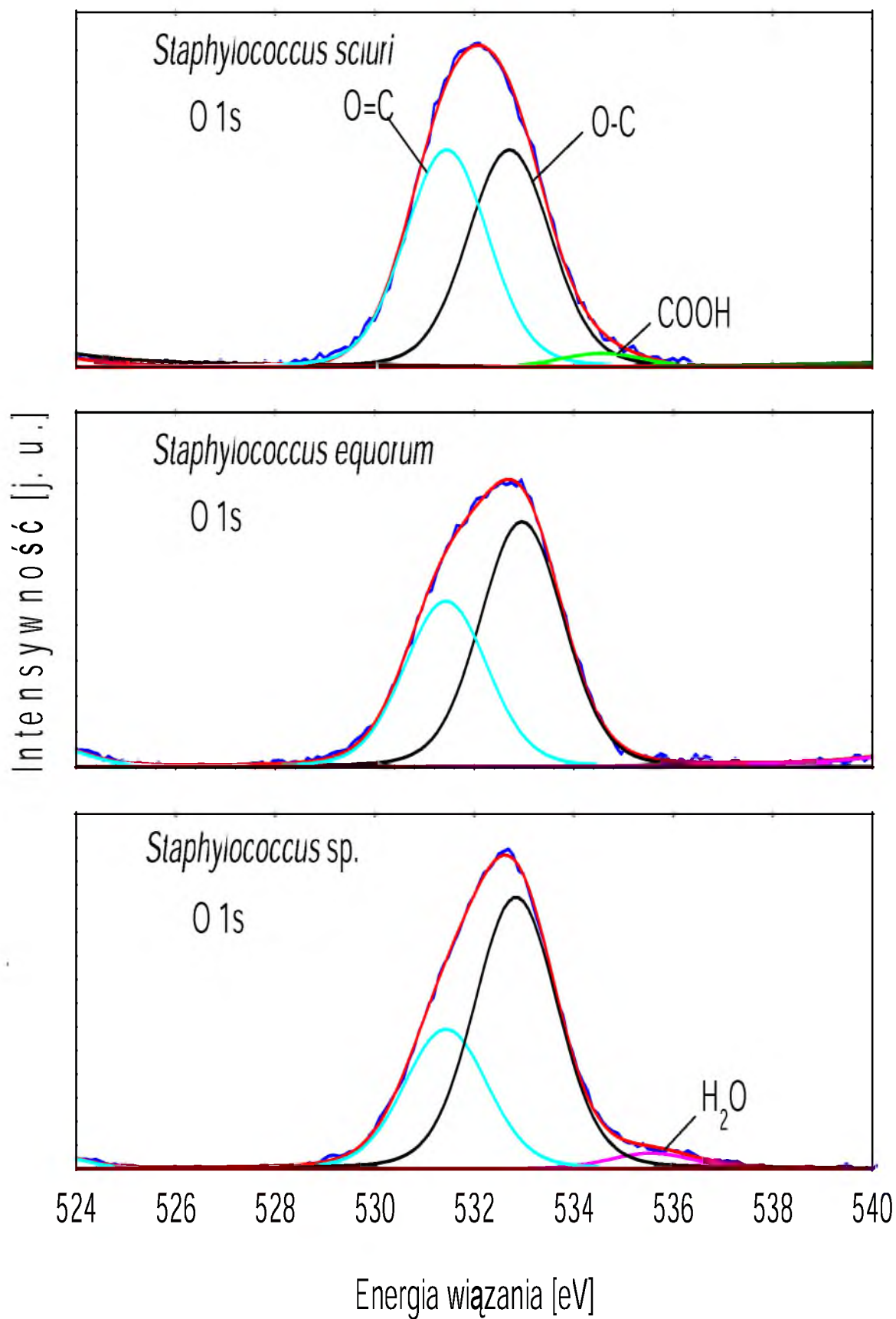
Wyniki analizy, osobno dla linii węgla (C1s), tlenu (O1s) i azotu (N1s), wraz z wyróżnieniem najbardziej prawdopodobnych wiązań (grup funkcyjnych), zestawiono na zbiorczych wykresach, w celu ich porównania (Rys. 44-46). Szczegółowych informacji o typach wiązań, ich energiach oraz udziałach dostarcza natomiast tabela nr 5.

Zaobserwowano, iż przedstawione linie węgla (C1s) w próbkach bakterii z rodzaju *Staphylococcus* rozkładały się na 3 singletowe linie spektralne, oddalone od siebie kolejno o około 1.5 eV. Sygnał przy energii wiązania  $E_w$  równej 285.0 eV widoczny dla wszystkich trzech przebadanych bakterii był najbardziej intensywny (od 55 do 68%). Pochodzi on od pojedynczego wiązania C-C pomiędzy atomami węgla oraz wiązania węgla z wodorem C-H. Linia ta odpowiada, zatem dwóm typom wiązań chemicznych, ponieważ nie można ich odróżnić ze względu na bardzo małą różnicę ich energii wiązania, w stosunku do rozdzielczości spektrometru. Intensywność sygnału kolejnej linii przy  $E_w = 286.5 \pm 0.5$  eV jest ok. 50% niższa niż sygnału przy 285.0 eV. Ta wartość energii orbitalu 1s atomu węgla związana jest z obecnością pojedynczych wiązań węgla z tlenem i węgla z azotem (C-O i C-N). Ostatnia linia, o najmniejszej intensywności (od 10 do 19%), znajdująca się przy  $E_w = 288.0 \pm 0.5$  eV, pochodzi od podwójnego wiązania węgla z tlenem C=O lub pojedynczego wiązania z dwoma atomami tlenu. Niewykluczone, że może ona również pochodzić od wiązania peptydowego HN-C=O.

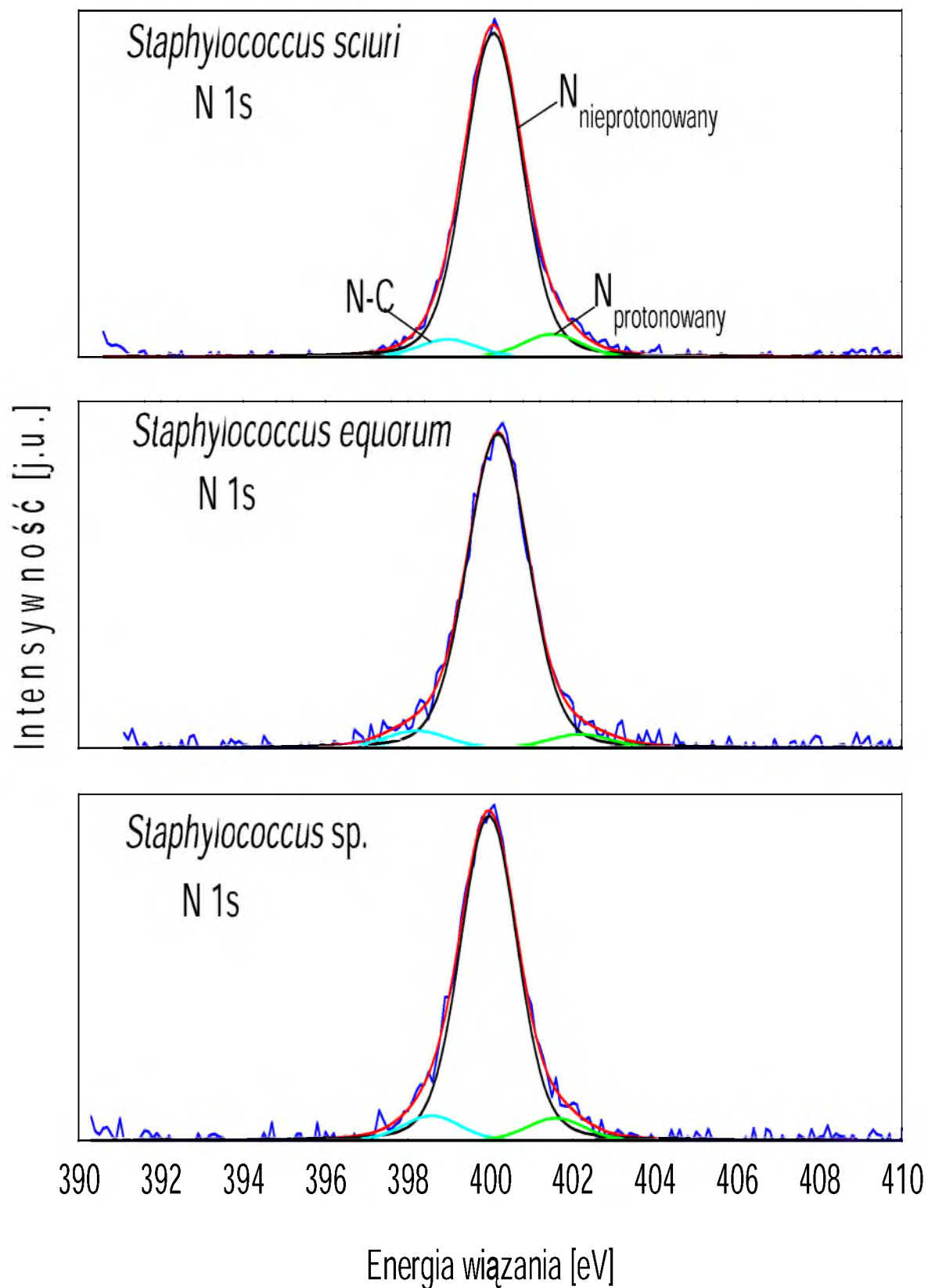
Rys. 44. Zestawienie dopasowania linii tlenu O1s dla bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus*.

Duża szerokość linii całkowitej O1s wskazuje na to, iż w rzeczywistości składa się ona z kilku linii syntetycznych o mniejszych szerokościach połówkowych i zbliżonych energiach wiązania. Dopasowano, zatem linie tlenu (O1s) stosując linie syntetyczne o szerokości połówkowej równej 1.8 eV (Rys. 45). Biorąc pod uwagę fakt, że według danych tablicowych energia wiązania dla linii O1s jest równa 531.0 eV, to jej przesunięcie chemiczne świadczyć może o tym, iż tlen w badanym przypadku występuje w różnych związkach chemicznych. Dopasowanie liniami syntetycznymi linii tego pierwiastka ujawniło, więc obecność złożonej struktury linii poziomów rdzenia na trzy główne składowe. Pierwsza z tych składowych, o mniejszej energii wiązania, we wszystkich przypadkach, przy takiej samej wartości energii wiązania tj. 531.4 eV, została utworzona przez fotoelektrony pochodzące od tlenu związanego podwójnie z węglem O=C. Druga linia pochodziła od wiązania O-C lub OH (C-OH). Może ona również pochodzić od wiązania C-O-C, a wartość energii, przy której się znajduje to około 532.7 eV. Trzecia linia O1s u bakterii *S. sciuri* pochodzi najprawdopodobniej od grupy karboksylowej COOH i występuje przy energii wiązania  $534.6 \pm 0.4$  eV, natomiast u bakterii *S. equorum* nie pojawia się ona wogóle. W przypadku natomiast *Staphylococcus* sp. ta trzecia linia powstała w wyniku najprawdopodobniej śladowej obecności wody, która wbudowana jest w ścianę komórkową tej próbki. Energia wiązania, przy której się pojawiła wynosi  $535.6 \pm 0.3$  eV.

Linia orbitalu N1s atomu azotu dla badanych komórek bakteryjnych rozkładała się na trzy części i we wszystkich próbkach wyróżnić tu możemy dwie linie o małej intensywności oraz jedną o znacznie większej (Rys. 46). Linia, której intensywność wynosiła ponad 85%, występująca przy energii wiązania  $399.9 \pm 0.3$  eV, najprawdopodobniej pochodzi od nieprotonowanej grupy aminowej. Dwie mniejsze linie o intensywności nieprzekraczającej 7%, pochodzą od pojedynczego wiązania azotu z węglem N-C, przy energii wiązania  $398.5 \pm 0.6$  eV oraz znajdująca się przy  $401.5 \pm 0.3$  eV od protonowanej grupy aminowej.

Rys. 45. Zestawienie dopasowania linii O1s dla bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus*.





Rys. 46. Zestawienie dopasowania linii azotu N1s dla bakterii Gram-dodatnich z rodzaju *Staphylococcus*.

Wszystkie przebadane próbki wykazywały złożony charakter linii spektralnych pochodzących od głównych pierwiastków (C1s, O1s i N1), co świadczy o tym, iż pierwiastki te występują w różnych połączeniach chemicznych. Składowe te, różniły się między sobą jedynie intensywnościami udziału poszczególnych grup funkcyjnych w zależności od gatunku danej bakterii. Ich intensywności dla poszczególnych wiązań, od których najprawdopodobniej pochodziły, podano w procentach w tabeli nr 5.

Tabela 5. Wyniki występowania C1s, O1s i N1s w różnych połączeniach chemicznych oraz ich intensywności dla badanych próbek.

Próbka	<i>Staphylococcus sciuri</i>			<i>Staphylococcus equorum</i>			<i>Staphylococcus sp.</i>		
	Sugerowane wiązanie	BE [eV]	I %	Sugerowane wiązanie	BE [eV]	I %	Sugerowane wiązanie	BE [eV]	I %
<b>C1s</b>	C-C, C-H	285.0	60	C-C, C-H	285.0	55	C-C, C-H	285.0	68
	C-O, C-N	286.4	26	C-O, C-N	286.4	27	C-O, C-N	286.6	23
	C=O, HN-C=O	288.1	14	C=O, HN-C=O	288.2	19	C=O, HN-C=O	288.5	10
<b>O1s</b>	O=C	531.4	48	O=C	531.4	61	O=C	531.4	64
	O-C-H, C-O-C	532.7	49	O-C-H, C-O-C	532.8	39	O-C-H, C-O-C	532.8	33
	COOH	534.6	3						
							H <sub>2</sub> O	535.6	4
<b>N1s</b>	N-C	398.0	5	N-C	398.8	7	N-C	398.5	7
	N <sub>nieprotonowany</sub>	400.1	89	N <sub>nieprotonowany</sub>	399.9	86	N <sub>nieprotonowany</sub>	400.3	87
	N <sub>protonowany</sub>	401.5	6	N <sub>protonowany</sub>	401.5	7	N <sub>protonowany</sub>	401.6	6

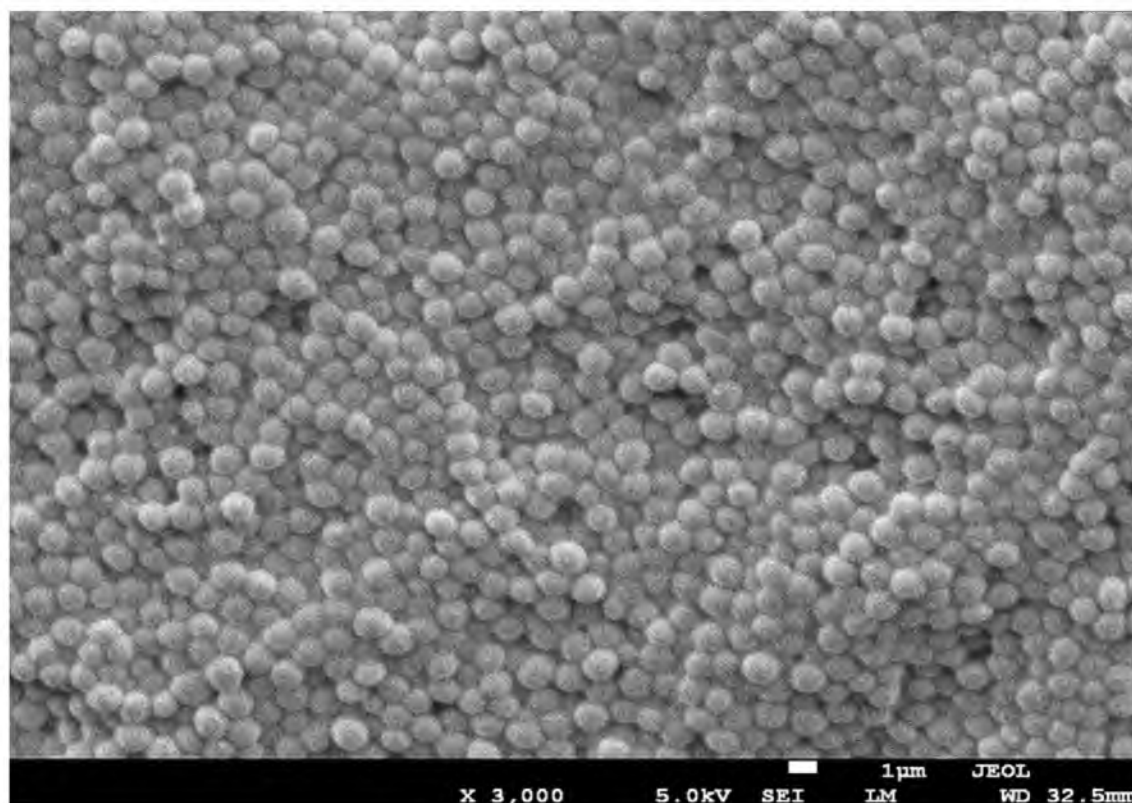
BE (Binding Energy) – energia wiązania (maximum piku-linii).

U wszystkich badanych bakterii dominuje ilościowo pojedyncze wiązanie węgla z węglem lub węglem z wodorem. Udział tych wiązań mieścił się w zakresie 55–68% i wynosił odpowiednio dla bakterii *S. sciuri* 60%, dla *S. equorum* 55%, zaś dla *Staphylococcus sp.* 68%. Kolejnym pod względem ilościowym wiązaniem jest węgiel pojedynczo związany z tlenem lub azotem, którego intensywność mieściła się w przedziale od

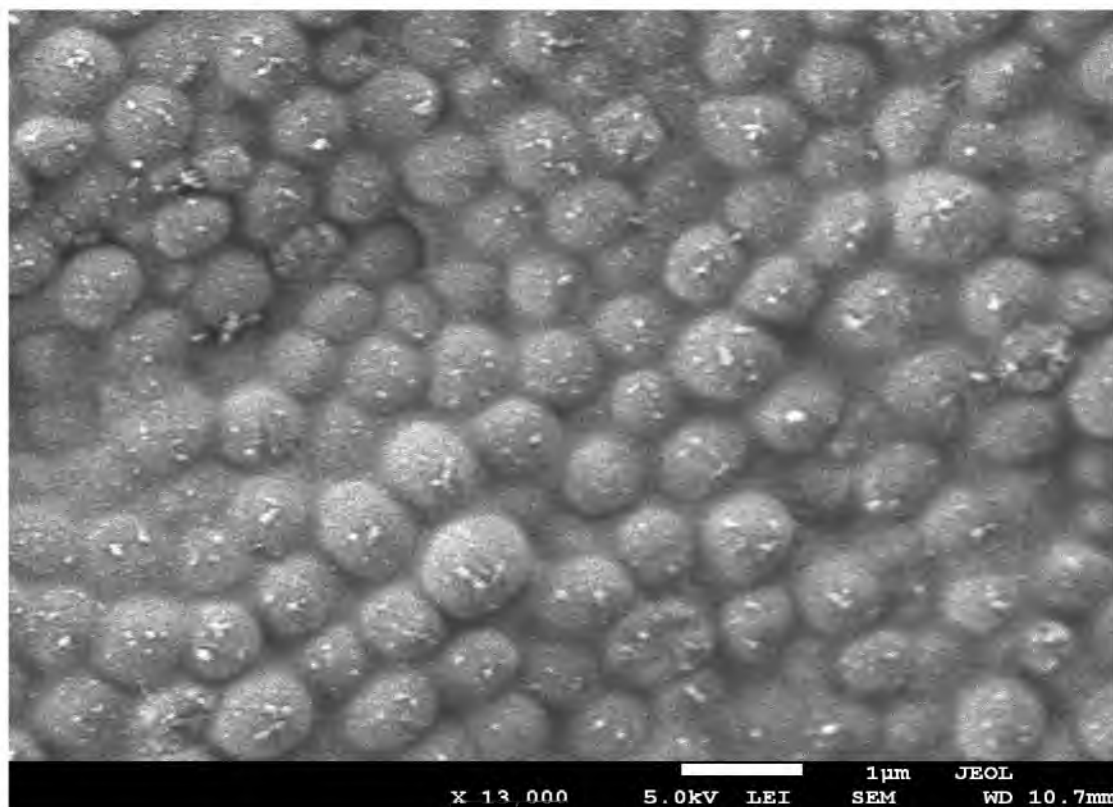
23 do 27% w zależności od gatunku bakterii. Najmniejszy udział stanowiło w tym przypadku dla orbitalu C1s podwójne wiązanie węgla z tlenem lub też wiązanie peptydowe  $\text{HN-C=O}$ , którego intensywność nie przekraczała 19%. Największe różnice uwidaczniały się natomiast w grupach funkcyjnych związanych z tlenem. Największy wkład w skład ściany komórkowej bakterii dały tu grupy  $\text{O=C}$  i stanowiły w *S. equorum* 61% udziału, natomiast w *Staphylococcus* sp. 64%. W przypadku próbki bakterii *S. sciuri* wiązanie to stanowiło jedynie 48%, natomiast największy udział w tym gatunku miało wiązanie  $\text{C-O-C}$  lub  $\text{O-C-H}$ , wynoszące 49%. U dwóch pozostałych gatunków bakterii ich intensywność mieściła się w zakresie 33-39%. Najmniejsze natomiast natężenie pochodziło najprawdopodobniej od wody w *Staphylococcus* sp. (4%) lub też od grupy  $\text{COOH}$  w *S. sciuri* (3%). W przypadku azotu, z kolei, największą intensywnością wykazywała się linia występująca przy energii wiązania około 400.0 eV, w każdej przebadanej próbce. Jej intensywność mieściła się w bardzo wysokim zakresie od 86 do 89%. Pozostałe wiązania ( $\text{N}_{\text{protonowany}}$  i  $\text{N-C}$ ) nie przekraczały intensywności powyżej 7%.

W celu poznania dokładnej powierzchni badanych gatunków bakterii, wykonano również zdjęcia ich topografii przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego firmy JOEL z działem polowym JSM-7600F (FE-SEM). Przeprowadzenie badania delikatnych, uwodnionych próbek biologicznych za pomocą SEM umożliwiła dodatkowa przystawka mroząca Cryo-SEM. Rozbudowany program do rejestracji i analizy obrazu, a także wysoka rozdzielczość i głęboka ostrość mikroskopu SEM pozwoliła na otrzymywanie obrazów struktur zewnątrzkomórkowych mikroorganizmów, mieszczących się w mikro- i nanometrycznej skali wielkości.

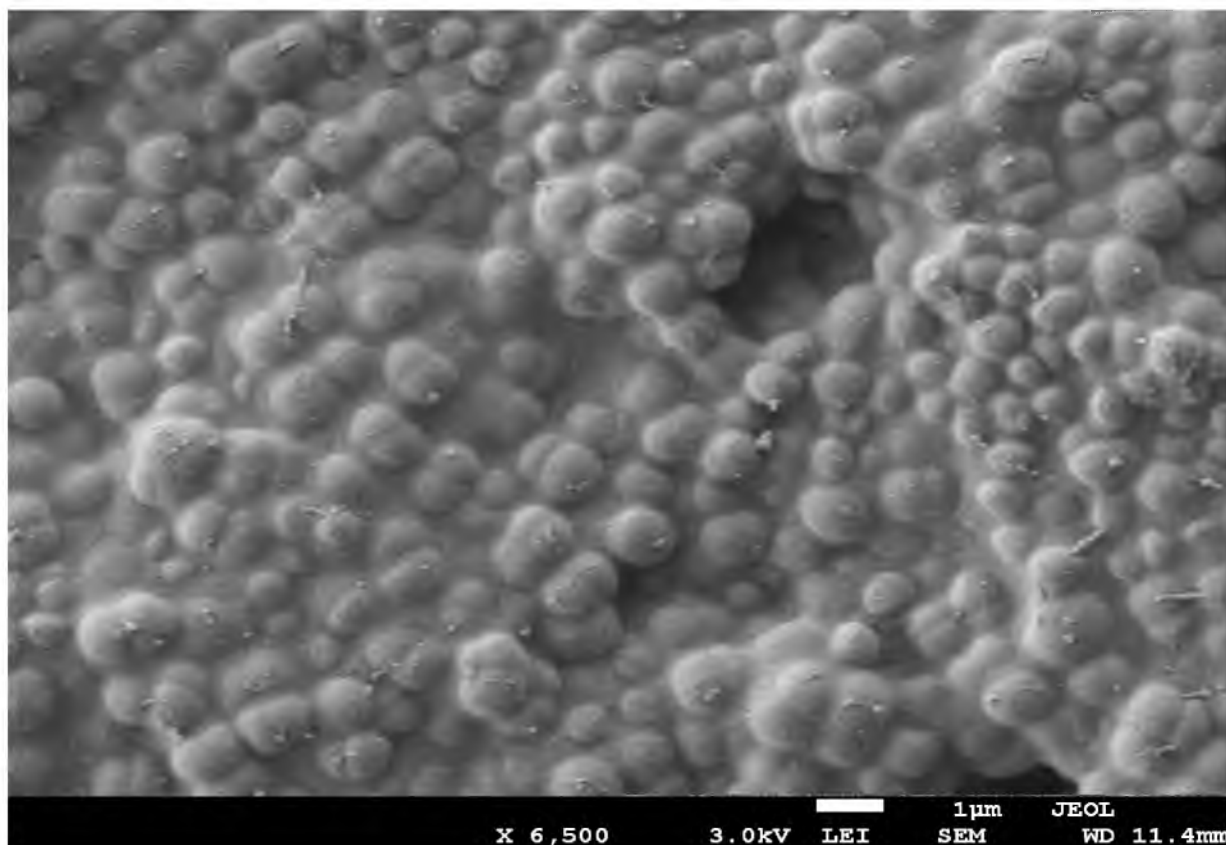
Przykłady zdjęć bakterii zebranych w gabinetach dentystycznych, wykonanych podczas badań na mikroskopie skaningowym, przedstawiono na mikrofotografiach nr 47-49. Wybrano po jednej reprezentatywnej mikrofotografii. Przedstawiają one kolonie ziarniaków z rodzaju *Staphylococcus* przy różnych powiększeniach. Widma fotoemisyjne XPS otrzymane w szerokim zakresie energii wiązania dla bakterii zebranych w danym środowisku znajdują się na końcu pracy (Rys. 80).



Rys. 47. Bakterie *Staphylococcus sciuri* widoczne pod mikroskopem elektronowym SEM (fot. E. Talik).



Rys. 48. Bakterie *S. equorum* widoczne pod mikroskopem elektronowym SEM (fot. E. Talik).



Rys. 49. Bakterie *Staphylococcus* sp. widoczne pod mikroskopem elektronowym SEM (fot. E. Talik).

Pierwsza mikrofotografia przedstawia bakterie *S. sciuri* przy powiększeniu 3 000 razy (Rys. 47). Wykonana została przy napięciu przyspieszającym 5.0 kV, z użyciem detektora elektronów wtórnych SEI (*Upper Secondary Electron Detector*). Przedstawia ona ogólny widok komórek bakterii ziarniaków, a tym samym, naturalną powierzchnię próbki. Umożliwia ona ocenę cech mikrostrukturalnych badanych bakterii, przede wszystkim ich kształtu oraz wielkości drobnoustrojów. Morfologicznie są to ziarniaki o wielkości nieco większej od 1 µm, występujące w skupiskach przypominających grona. Zdjęcie numer 48 przedstawia natomiast mikroorganizmy *S. equorum*, przy powiększeniu 13 000 razy. Drobnoustroje te mają bardziej regularny kształt kulisty i osiągają rozmiary w granicach od 0,8 do 1 µm. Zauważalne było przestrzenne ułożenie tych komórek, co osiągalne jest tylko dzięki szybkiemu zamrożeniu próbki. Dzięki temu obserwowano tu bakterie w ich naturalnym stanie uwodnionym, a obraz ten był w pełni tożsamy z ich rzeczywistym wyglądem. Oprócz kształtu i wielkości komórek, dodatkowo uwidoczniono najprawdopodobniej biofilm, który wytworzył się wokół tych bakterii. Powoduje on, że są one zbite w jedną całość, gdyż wypełnia on przestrzeń pomiędzy komórkami *S. equorum*. Widoczne natomiast na powierzchni drobne ziarnistości są najprawdopodobniej pozostałością po zamrożeniu

materiału w ciekłym azocie i zbyt krótkim czasem sublimacji. Zdjęcie wykonano z użyciem detektora elektronów wtórnych LEI (*Lower Secondary Elektron Detektor*) oraz przy napięciu przyspieszającym 5.0 kV.

Przedstawione na ostatnim zdjęciu (Rys. 49) bakterie, to również jeden z obecnie znanych 36 gatunków bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Zdjęcie to wykonano przy użyciu powiększenia 6 500 razy, detektora elektronów wtórnych LEI i napięcia równego 3.0 kV. Widoczne na nim bakterie mają różne wielkości (nie większe niż 1  $\mu\text{m}$ ) oraz zróżnicowane kształty przypominające ziarna (kuliste, owalne bądź nieregularne). Wyraźnie widoczny jest również trwający podział komórek. W przestrzeniach pomiędzy drobnoustrojami zauważono także niewielkie ilości polimerycznych substancji EPS, w których zanurzone są komórki.

## 7.2. Analiza powierzchniowych struktur bakterii zebranych z oczyszczalni ścieków

Analizom poddano również bakterie pobrane z obszarów oczyszczalni ścieków, znajdujących się na terenie województwa śląskiego. Głównymi źródłami powstawania aerozoli w tym środowisku są komory napowietrzania osadu czynnego, skąd pobierano próbki. Zebrane przy pomocy impaktora bakterie identyfikowano z użyciem testów biochemicznych API. Spośród zidentyfikowanych bakterii do szczegółowych badań wybrano pięć z nich, trzy gatunki bakterii z rodzaju *Staphylococcus*: *S. gallinarum*, *S. xylosus* i *S. lentus* oraz dwa z rodzaju *Bacillus*: *B. mycoides* i *B. cereus*. Oba te rodzaje drobnoustrojów należą do bakterii Gram-dodatnich, szeroko rozpowszechnionych w środowisku oczyszczalni ścieków.

Jak w przypadku poprzednich bakterii, materiał ten zbadano za pomocą techniki XPS, która na podstawie otrzymanych widm przeglądowych pozwoliła na uzyskanie informacji o składzie procentowym poszczególnych pierwiastków obecnych na powierzchni badanego materiału. Otrzymane widma przeglądowe XPS w szerokim zakresie energii (0-1 400 eV) odpowiednio dla wszystkich pięciu przebadanych bakterii przedstawiono na rysunkach zamieszczonych na końcu pracy (Rys. 81). Zaobserwowano na nich wyraźne linie węgla, tlenu, azotu i sodu. Poza tym widoczne są mniejsze linie takich pierwiastków jak: fosfor, siarka, chlor, krzem oraz w próbkach bakterii z rodzaju *Bacillus*, niewielkie ilości żelaza.

W oparciu o widma przeglądowe XPS zarejestrowanych pierwiastków, przeprowadzono ich analizę ilościową. Obliczone wartości stężeń atomowych zestawiono w tabeli numer 6 i 7. Do obliczeń wykorzystano pola powierzchni odpowiednich linii spektralnych pierwiastków zidentyfikowanych na powierzchni próbki. We wszystkich

badanych bakterii z rodzaju *Staphylococcus* dominował węgiel (C1s), a jego udział często przekraczał sumaryczny udział pozostałych pierwiastków (ponad 64%). Tlen, jeżeli chodzi o zawartość procentową w próbce, jest drugim w kolejności występującym pierwiastkiem, a jego intensywność mieściła się w zakresie od 20,90 do 24,29%, w zależności od gatunku bakterii. Następną główną linią spektralną o największej intensywności był azot (N1s). W gatunku *S. lentus* średni udział azotu w zewnętrznych strukturach komórkowych bakterii wynosił ponad 12%, natomiast u dwóch pozostałych gatunków był on zdecydowanie niższy (nie przekraczał 8%). W badanych bakterii wykazano również obecność takich pierwiastków jak: sód, fosfor, krzem, chlor, siarka oraz w *S. lentus* śladową ilość magnezu. W większości przypadków ich udział nie przekraczał 1% atomowego (Tab. 6), co pozwoliło zaklasyfikować je do grupy składników pobocznych.

Tabela 6. Koncentracja atomowa pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowych struktur bakterii *S. gallinarum*, *S. xylosus* i *S. lentus* określona metodą XPS.

Udział procentowy pierwiastków [% at.]									
Gatunek bakterii	C1s	O1s	N1s	Na1s	P2p	Si2p	Cl2p	S2p	Mg2p
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	65,27	24,29	7,88	1,09	1,14	0,21	0,08	0,05	0,00
<i>Staphylococcus xylosus</i>	68,96	20,90	7,07	0,88	0,73	1,38	0,05	0,04	0,00
<i>Staphylococcus lentus</i>	64,22	21,68	12,15	0,35	1,03	0,08	0,15	0,13	0,21

W próbkach bakterii z rodzaju *Bacillus* także dominował węgiel, a jego procentowy udział wynosił od 67,77 do 71,13%. Do głównych pierwiastków wchodzących w skład tych bakterii należał również tlen (intensywność od 19,57 do 23,12%) oraz azot (6,80-7,67%). Pozostałe pierwiastki (Na, P, Si, Cl, S i Fe), które stanowiły maksymalnie 2,31% składu próbki dla *B. cereus* i 1,64% dla *B. mycoides* to tzw. pierwiastki akcesoryczne. W próbkach tych pojawiło się dodatkowo, w śladowych ilościach żelazo (intensywność 0,08 i 0,11%), które najprawdopodobniej zostało zmetabolizowane przez osobniki tego gatunku z podłoża namnażającego, wzbogaconego 5% dodatkiem krwi baraniej.

Tabela 7. Koncentracja atomowa pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowych struktur bakterii *B. mycoides* i *B. cereus* określona metodą XPS.

Udział procentowy pierwiastków [% at.]									
Gatunek bakterii	C1s	O1s	N1s	Na1s	P2p	Si2p	Cl2p	S2p	Fe2p3
<i>Bacillus mycoides</i>	71,13	19,57	7,67	0,81	0,12	0,19	0,30	0,14	0,08
<i>Bacillus cereus</i>	67,77	23,12	6,80	1,15	0,28	0,10	0,53	0,14	0,11

Stosunki koncentracji tlenu, azotu i fosforu w odniesieniu do całkowitej zawartości węgla wykrytego w badanym materiale dla dwóch rodzajów bakterii *Staphylococcus* i *Bacillus* przedstawiono odpowiednio w tabelach numer 8 i 9.

Tabela 8. Stosunek koncentracji O/C, N/C i P/C dla bakterii z rodzaju *Staphylococcus*.

Gatunek bakterii	O/C	N/C	P/C
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	0,372	0,121	0,017
<i>Staphylococcus xylosus</i>	0,303	0,103	0,011
<i>Staphylococcus lentus</i>	0,338	0,189	0,016

Tabela 9. Stosunek koncentracji O/C, N/C i P/C dla bakterii z rodzaju *Bacillus*.

Gatunek bakterii	O/C	N/C	P/C
<i>Bacillus mycoides</i>	0,275	0,108	0,002
<i>Bacillus cereus</i>	0,341	0,100	0,004

Dla próbek pochodzących z oczyszczalni ścieków wykonano, również identyfikację stanów chemicznych, reprezentowanych przez poszczególne linie. W tym celu dopasowano liniami syntetycznymi linie rdzeniowe węgla (C1s), tlenu (O1s) oraz azotu (N1s), dzięki czemu zidentyfikowano typy wiązań odpowiadające poszczególnym stanom chemicznym danego pierwiastka. Linie tych pierwiastków zawsze składały się z kilku składowych (od 3 do 5), o przybliżonej energii wiązania oraz intensywności. Dopasowanie to umożliwiło określenie grup funkcyjnych wchodzących w skład związków chemicznych budujących powierzchniowe warstwy komórek bakterii z rodzaju *Staphylococcus* oraz *Bacillus*, a także obliczenie ich intensywności. Uwzględniono przy tym przesunięcia chemiczne



charakterystyczne dla określonych wiązań. Wyniki analizy dla trzech bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (*S. gallinarum*, *S. xylosus*, *S. lentus*) przedstawiono na zbiorczych rysunkach 50-52, a szczegółowych informacji o grupach funkcyjnych odpowiadającym danym linią dostarcza tabela numer 10.

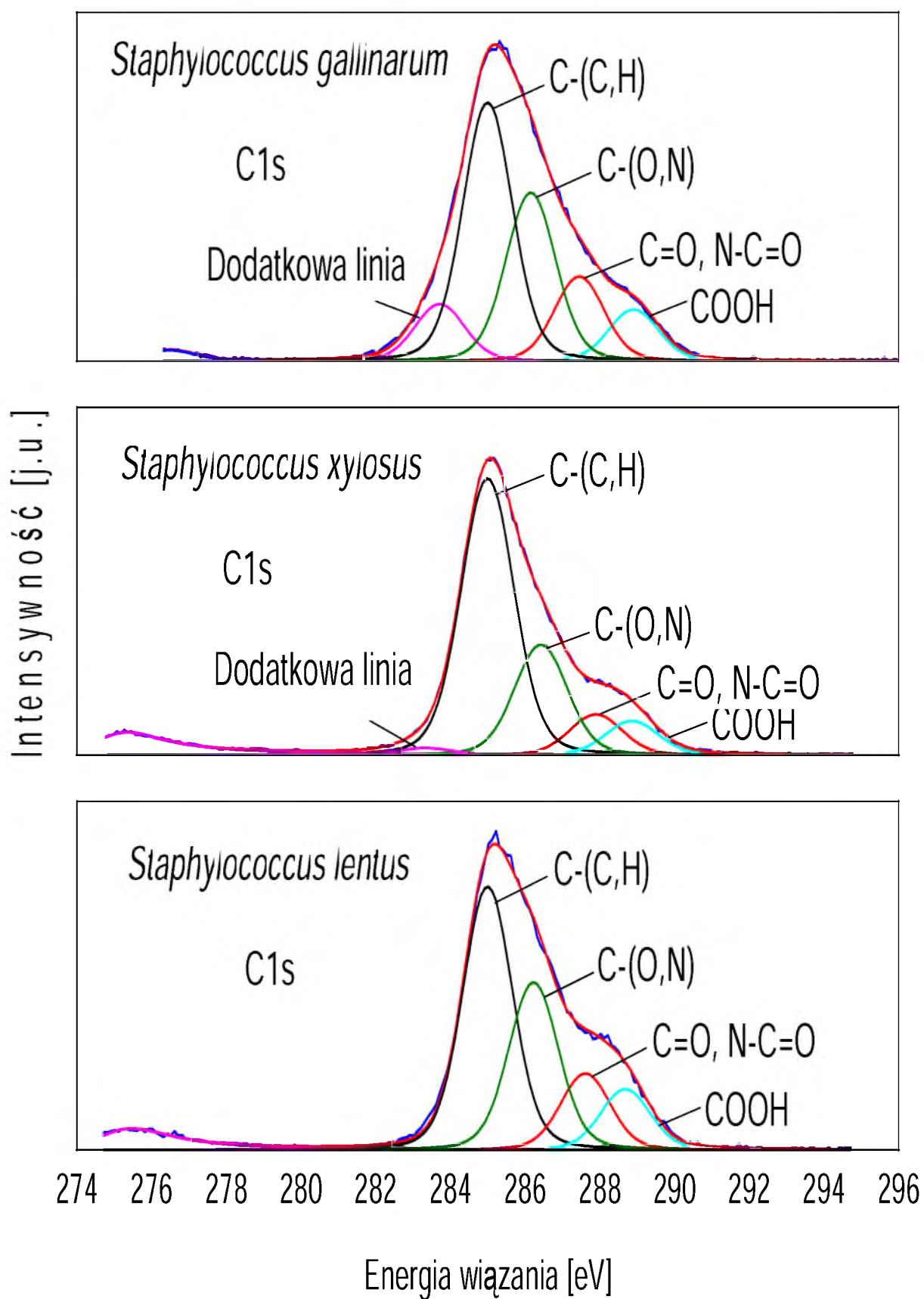
Linie węgla (C1s) w próbkach z rodzaju *Staphylococcus* rozkładały się na 4 singletowe linie spektralne. Najbardziej intensywny pik, o energii wiązania 285.0 eV, pochodził od wiązania C-C lub C-H, czyli grupy węglowodorowej. Dominowały one we wszystkich próbkach i znacznie przewyższały pozostałe swą intensywnością (zakres od 42-56% w zależności od gatunku bakterii – tabela nr 10). Kolejna linia pochodziła od pojedynczego wiązania węgla z tlenem i węgla związanego pojedynczo z azotem (C-O i C-N). Grupy te występowały przy energii wiązania  $286.4 \pm 0.3$  eV, a ich intensywności wynosiły od 24 do 28%. Następną linią pochodziła od podwójnego wiązania węgla z tlenem C=O lub pojedynczego wiązania z dwoma atomami tlenu (O-C-O), a także być może od wiązania peptydowego HN-C=O. Znajdowały się one przy  $288.8 \pm 0.4$  eV i stanowiły od 9 do 16% intensywności. Czwartą linią było wiązanie COOH o natężeniu 6-8% i pojawiało się przy  $289.0 \pm 0.5$  eV. W próbkach bakterii *S. gallinarum* i *S. xylosus* wystąpiła również dodatkowa linia przy około  $283.6 \pm 0.4$  eV, odpowiednio o natężeniu 9 i 4%, która nie została do tej pory opisana w literaturze.

Z analizy linii tlenu (O1s) wynika, iż składała się ona z kilku związków chemicznych, o czym świadczy jej podział na 3 singletowe linie. Wynikają one z obecność złożonej struktury linii poziomów rdzenia dla tego pierwiastka. Pierwsza z linii wykrytych u bakterii z rodzaju *Staphylococcus* o najmniejszej energii wiązania, tj.  $531.0 \pm 0.4$  eV, została utworzona przez fotoelektrony pochodzące od tlenu związanego podwójnie z węglem (O=C). Intensywność tego wiązania była znacznie większa u bakterii z gatunku *S. lentus* (47%) niż u pozostałych przebadanych gatunków (*S. gallinarum* 20%, *S. xylosus* 11%). Druga linia pochodziła od wiązania O-C-H, albo wiązania C-O-C. Linia ta pojawiła się przy energii wiązania równej około  $532.2 \pm 0.2$  eV i u bakterii *S. lentus* stanowiła 28% natomiast u dwóch pozostałych 53 i 56%. Trzecia linia O1s u mikroorganizmów badanego rodzaju pochodziła najprawdopodobniej od ugrupowania kwasu karboksylowego O-C=O i występowała przy energii wiązania  $533.4 \pm 0.4$  eV (odpowiednio 23 i 31%). W próbkach *S. xylosus* i *S. lentus* natomiast pojawiła się czwarta linia o natężeniu 2%, przy  $535.5 \pm 0.3$  eV, powstała najprawdopodobniej w wyniku obecności minimalnej ilości wody w strukturze komórkowej tych bakterii.

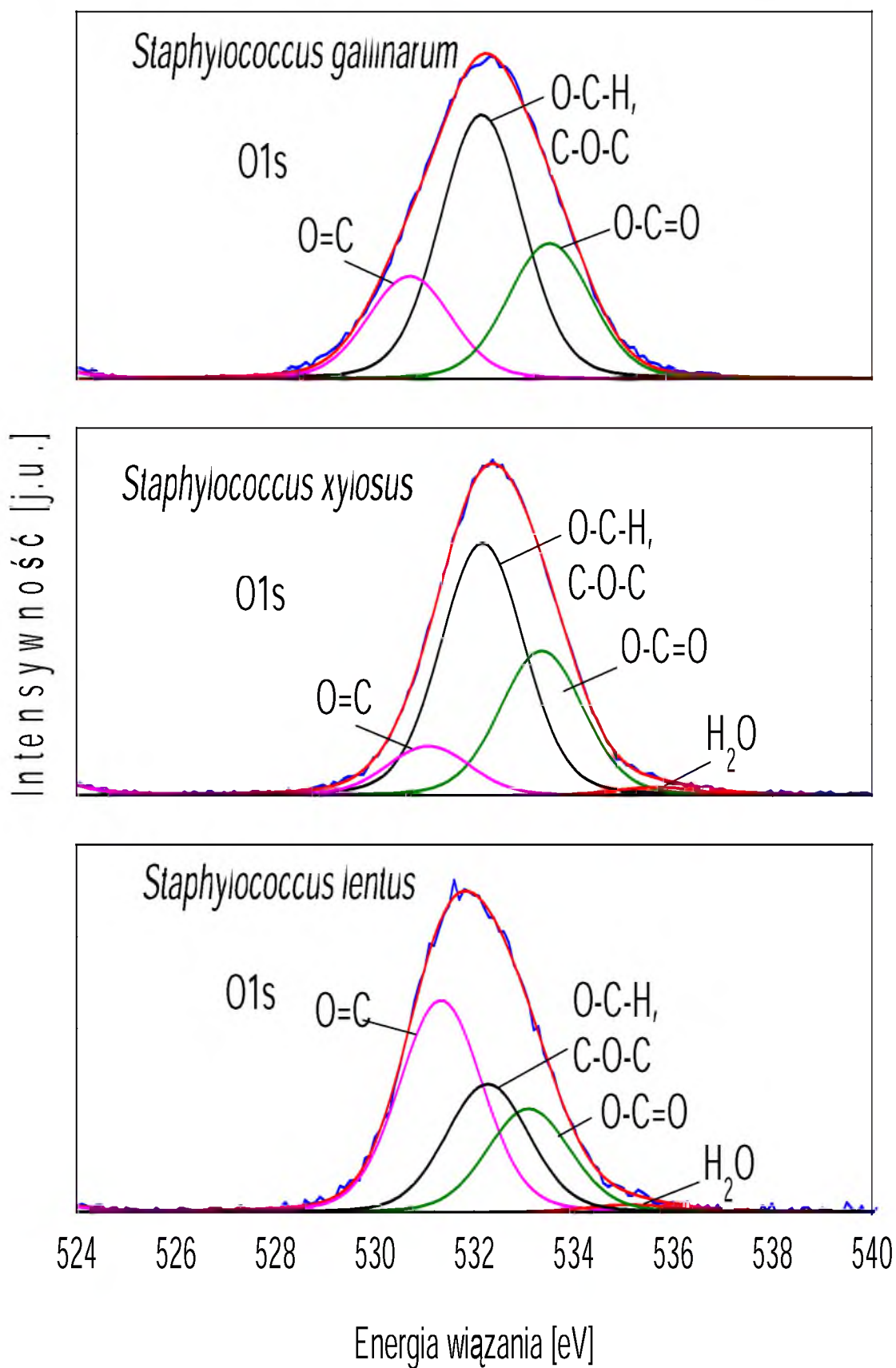
Tabela 10. Wyniki występowania C1s, O1s i N1s w różnych połączeniach chemicznych oraz ich intensywności dla badanych bakterii.

Próbka	<i>Staphylococcus gallinarum</i>			<i>Staphylococcus xylosus</i>			<i>Staphylococcus lentus</i>		
	Sugerowane wiązanie	BE [eV]	I %	Sugerowane wiązanie	BE [eV]	I %	Sugerowane wiązanie	BE [eV]	I %
<b>C1s</b>	Dodatkowa linia	283.7	9	Dodatkowa linia	283.4	4			
	C-C, C-H	285.0	42	C-C, C-H	285.0	56	C-C, C-H	285.0	50
	C-O, C-N	286.2	27	C-O, C-N	286.4	24	C-O, C-N	286.3	28
	C=O, HN-C=O	287.5	14	C=O, HN-C=O	287.9	9	C=O, HN-C=O	287.6	16
	COOH	288.9	8	COOH	288.9	7	COOH	288.7	6
<b>O1s</b>	O=C	530.7	20	O=C	531.1	11	O=C	531.3	47
	O-C-H, C-O-C	532.2	53	O-C-H, C-O-C	532.2	56	O-C-H, C-O-C	532.3	28
	O-C=O	533.5	27	O-C=O	533.4	31	O-C=O	533.1	23
				H <sub>2</sub> O	535.8	2	H <sub>2</sub> O	535.2	2
<b>N1s</b>	N-C	398.4	15	N-C	399.1	8	N-C	399.1	14
	Nnieprotonowany	399.9	61	Nnieprotonowany	400.4	85	Nnieprotonowany	400.2	78
	Nprotonowany	400.8	24	Nprotonowany	401.8	7	Nprotonowany	401.6	8

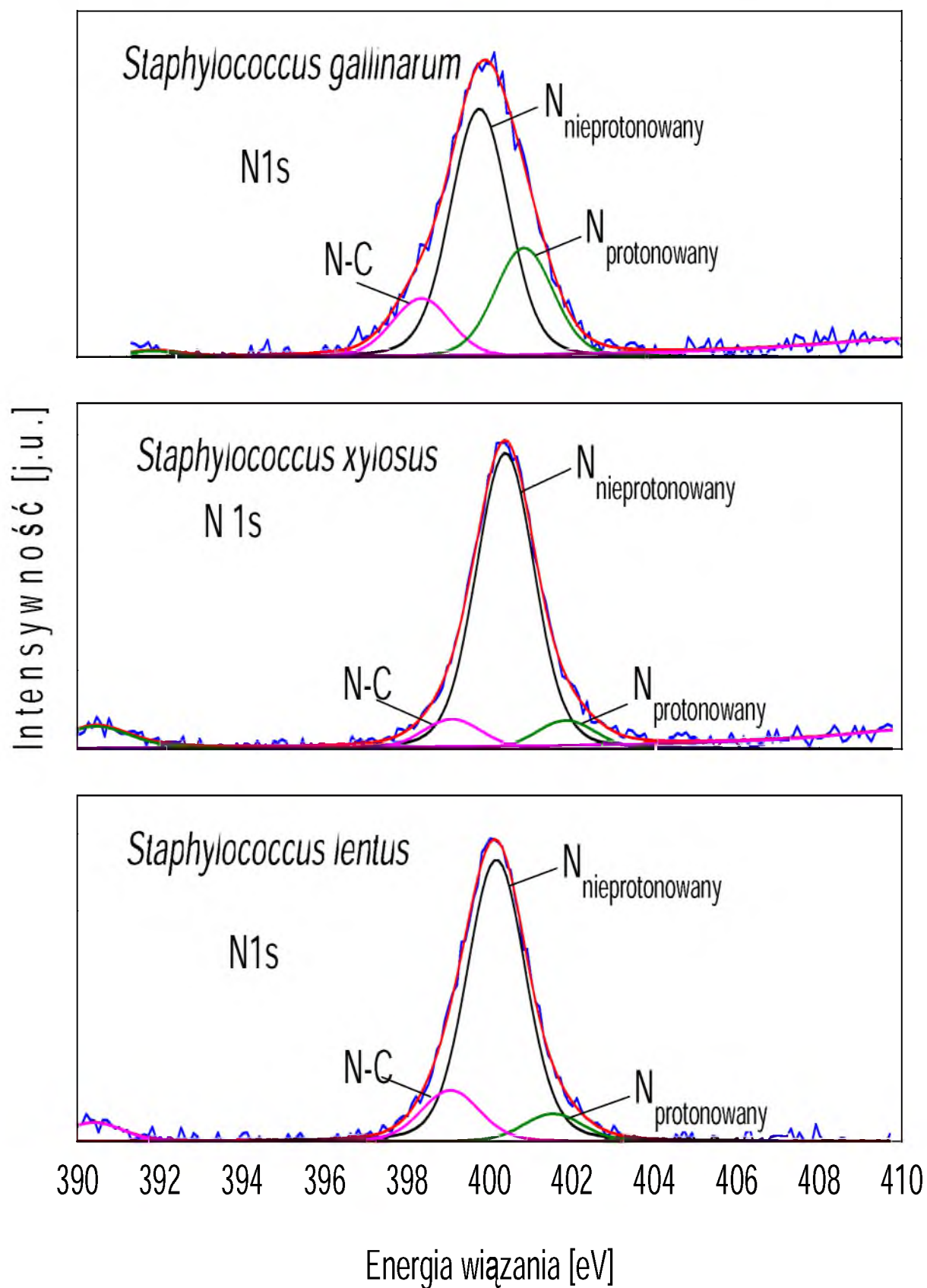
Linie azotu (N1s) we wszystkich próbkach z rodzaju *Staphylococcus* po dopasowaniu rozkładały się na trzy składowe. Wyróżniamy tutaj dwie linie o małej intensywności i jedną o intensywności wielokrotnie przekraczającej wartość dwóch pozostałych. Pierwsza z nich, występująca przy energii wiązania około  $398.5 \pm 0.6$  eV pochodziła od pojedynczego wiązania azotu z węglem (N-C), a jej intensywność wynosiła od 8 do 15%. Największa z linii znajdowała się natomiast przy  $400.1 \pm 0.3$  eV. Jej natężenie było zróżnicowane w zależności od gatunku bakterii, gdyż w *S. gallinarum* stanowiło 61% intensywności, natomiast w *S. xylosus* i *S. lentus* wzrastało ono odpowiednio do 85% i 78%. Ostatnia z linii, pojawiła się przy najwyższej energii wiązania, wynoszącej  $401.3 \pm 0.6$  eV. Tutaj również w przypadku bakterii *S. gallinarum* intensywność tego wiązania znacznie różniła się od pozostałych gatunków bakterii tego rodzaju, gdyż wynosiła 24%, przy czym u dwóch pozostałych nie przekraczała 8%. Wyniki znajdujące się w tabeli nr 10, przedstawiają zbiorcze zestawienie wszystkich danych dotyczących grup funkcyjnych występujących w powierzchniowej warstwie bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, pobranych na terenie oczyszczalni ścieków.



Rys. 50. Dopasowanie linii C1s u bakterii z rodzaju *Staphylococcus* pochodzących z oczyszczalni ścieków.



Rys. 51. Dopasowanie linii O1s u bakterii z rodzaju *Staphylococcus* pochodzących z oczyszczalni ścieków.

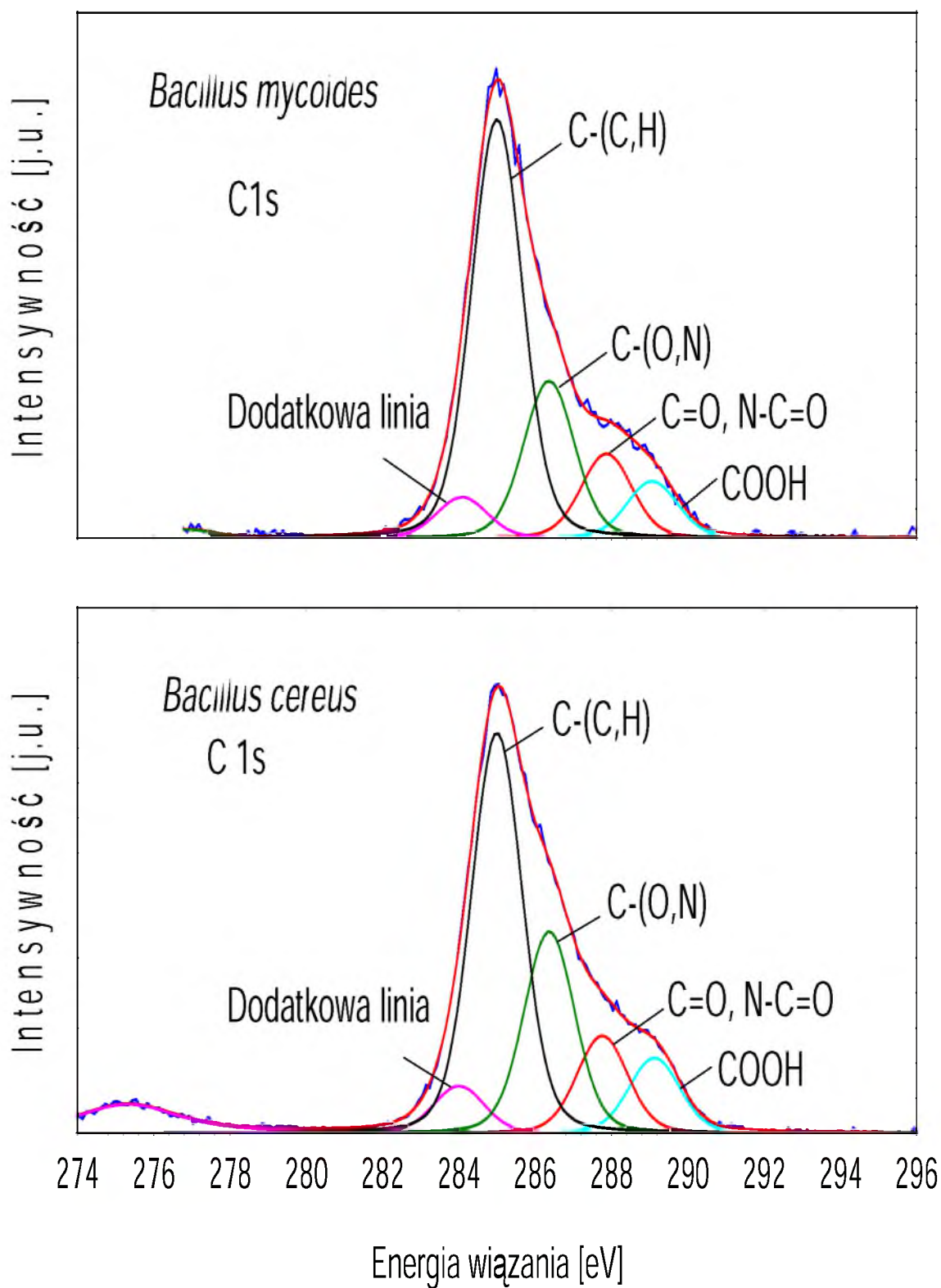


Rys. 52. Dopasowanie linii N1s u bakterii z rodzaju *Staphylococcus* pochodzących z oczyszczalni ścieków.

Dopasowanie linii syntetycznych dla węgla, tlenu i azotu dwóch bakterii z rodzaju *Bacillus* pozwoliło również na ilościowe określenie grup funkcyjnych wchodzących w skład związków chemicznych budujących ściany komórkowe tych mikroorganizmów (Rys. 53-55). Na podstawie energii wiązania dla linii C1s, O1s i N1s po ich dopasowaniu ustalono, że badane struktury powierzchniowe bakterii *B. mycoides* i *B. cereus* składały się z podobnych sygnałów (od 3 do 5 składowych), tym samym, z takich samych grup funkcyjnych (Tab. 11). Wykazywały one duże podobieństwo, jeśli chodzi o energię wiązania poszczególnych linii, a jedyne różnice, jakie występowały między nimi, to intensywności wykrytych wiązań chemicznych oraz pojawienie się niewielkiej ilości wody u bakterii *B. cereus*, w linii tlenu, przy  $E_w = 535.8$  eV. W obu gatunkach bakterii wystąpiła również dodatkowa linia, w pikie węgla, przy energii wiązania około  $284.0 \pm 0.2$  eV o intensywności w zakresie 6% u *B. mycoides* i 10% u *B. cereus*.

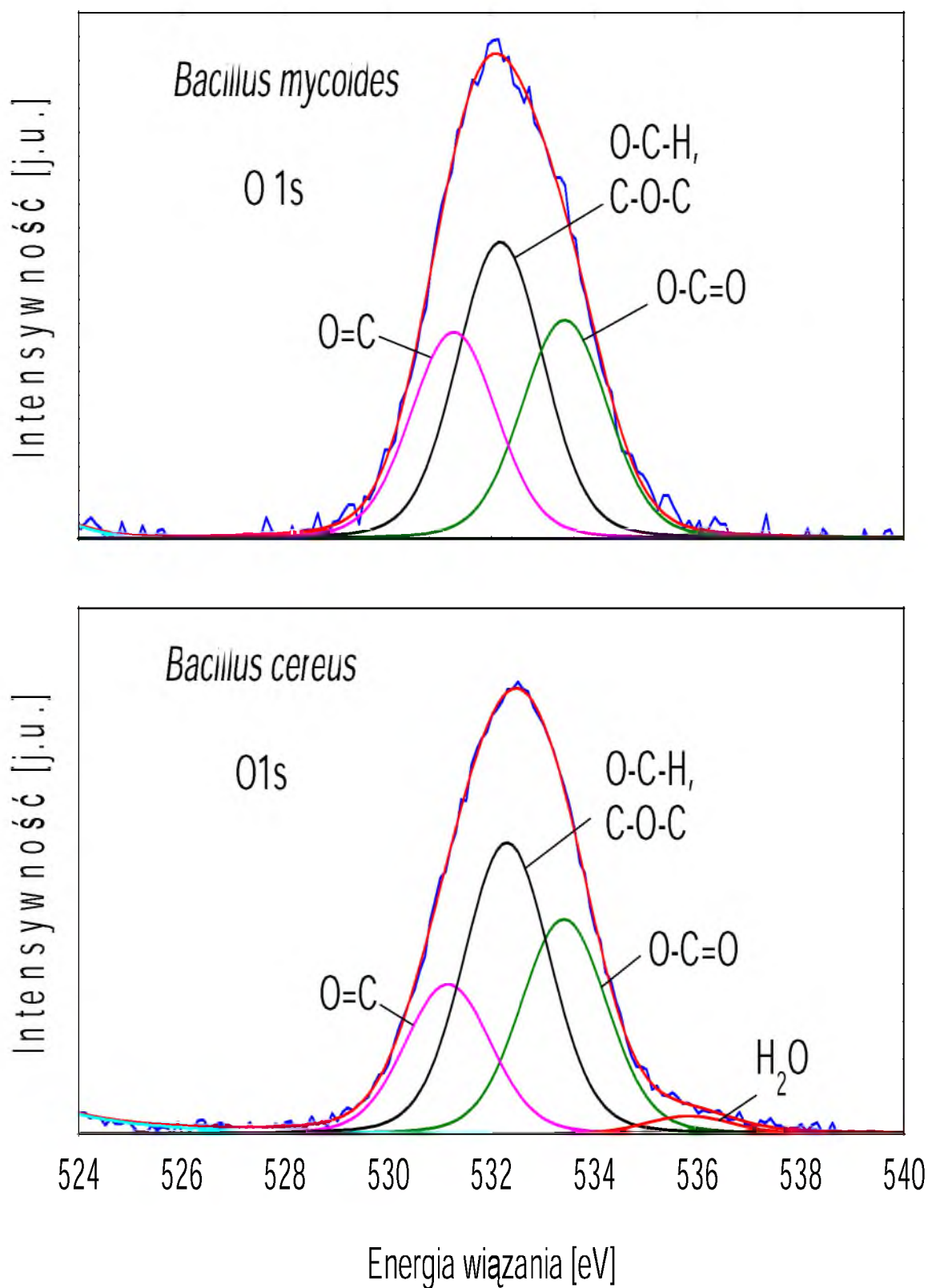
Tabela 11. Wyniki występowania C1s, O1s i N1s w różnych połączeniach chemicznych oraz ich intensywności dla badanych bakterii.

Próbka	<i>Bacillus mycoides</i>			<i>Bacillus cereus</i>		
	Sugerowane wiązanie	Energia wiązania [eV]	I %	Sugerowane wiązanie	Energia wiązania [eV]	I %
<b>C1s</b>	Dodatkowa linia	284.1	6	Dodatkowa linia	284.0	10
	C-(C, H)	285.0	54	C-(C, H)	285.0	44
	C-(O, N)	286.4	21	C-(O, N)	286.4	25
	C=O, HN-C=O	287.8	12	C=O, HN-C=O	287.8	12
	COOH	289.1	7	COOH	289.2	9
<b>O1s</b>	O=C	531.2	29	O=C	531.2	22
	O-C-H, C-O-C	532.1	41	O-C-H, C-O-C	532.3	43
	O-C=O	533.4	30	O-C=O	533.4	32
				H <sub>2</sub> O	535.8	3
<b>N1s</b>	N-C	398.2	9	N-C	398.4	16
	N <sub>nieprotonowany</sub>	399.9	81	N <sub>nieprotonowany</sub>	400.0	75
	N <sub>protonowany</sub>	401.2	10	N <sub>protonowany</sub>	401.5	9



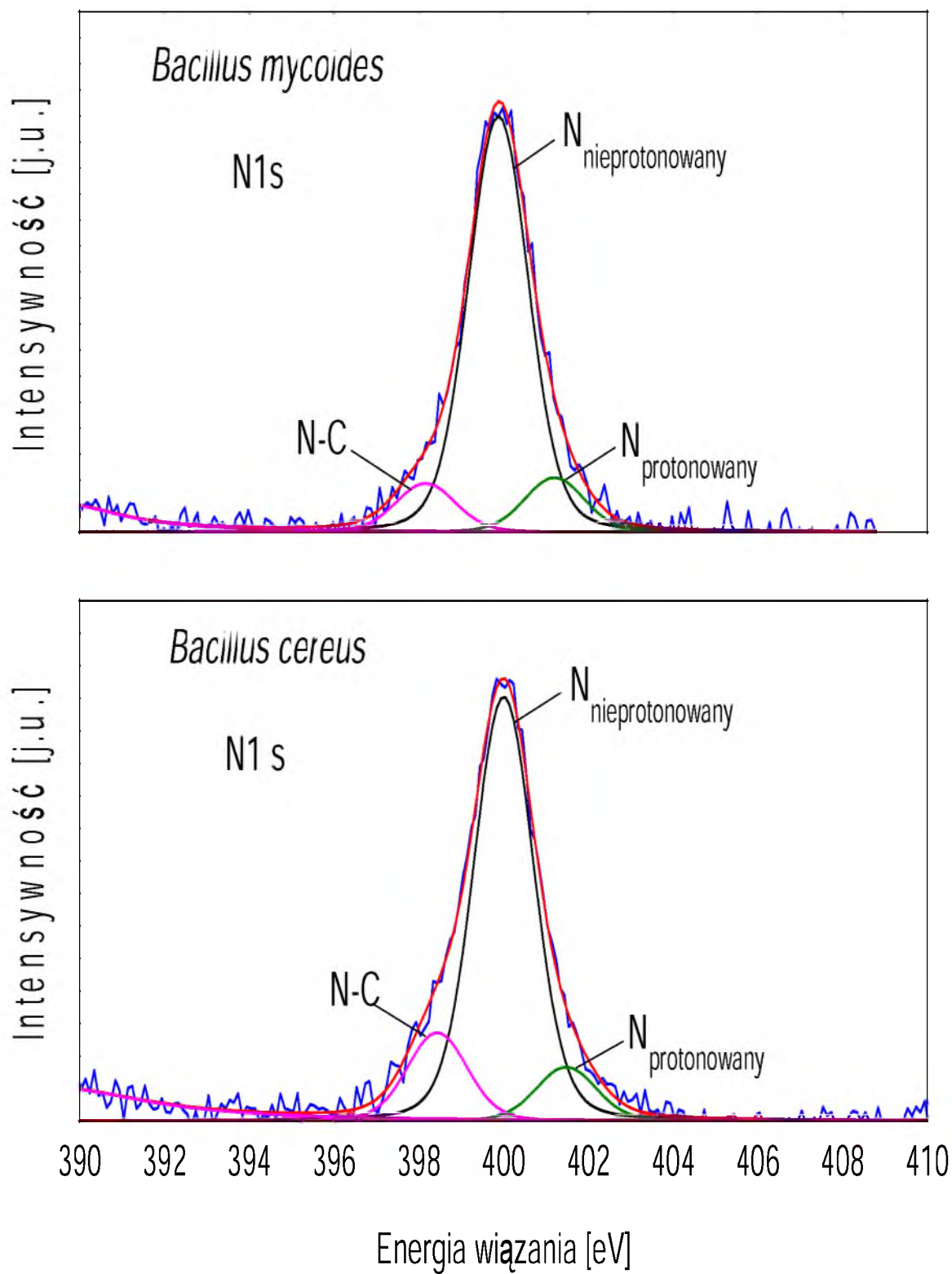
Rys. 53. Dopasowanie linii C1s u bakterii z rodzaju *Bacillus* pochodzących z oczyszczalni ścieków.





Rys. 54. Dopasowanie linii O1s u bakterii z rodzaju *Bacillus* pochodzących z oczyszczalni ścieków.

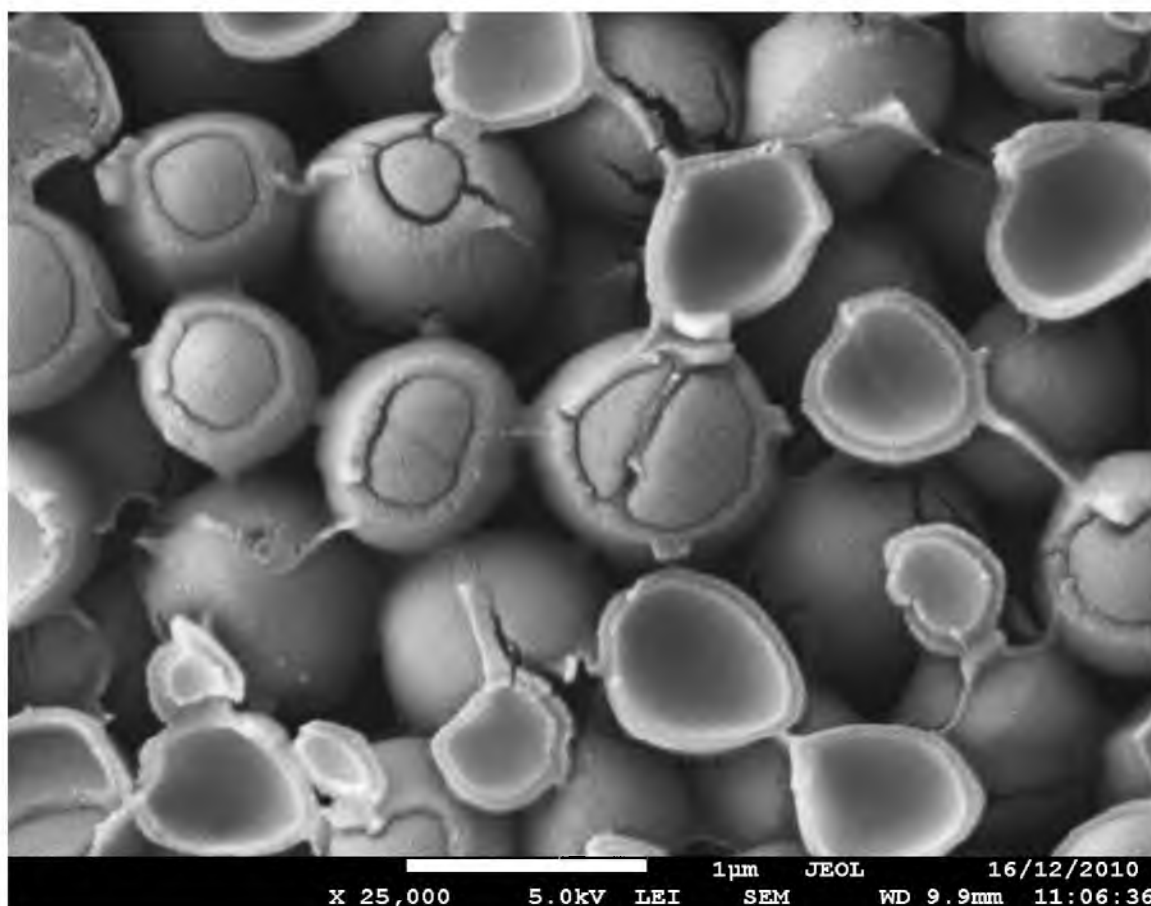




Rys. 55. Dopasowanie linii N1s u bakterii z rodzaju *Bacillus* pochodzących z oczyszczalni ścieków.

Prócz analizy jakościowej i ilościowej pierwiastków oraz określeniu grup funkcyjnych w badanych strukturach, wykonano również zdjęcia mikroskopowe z wykorzystaniem elektronowego mikroskopu skaningowego SEM. Wykonane mikrofotografie umożliwiały obserwację topografii powierzchni bakterii, jak również jej przełamów, po wcześniejszym ich przecięciu zmrożonym ostrzem.

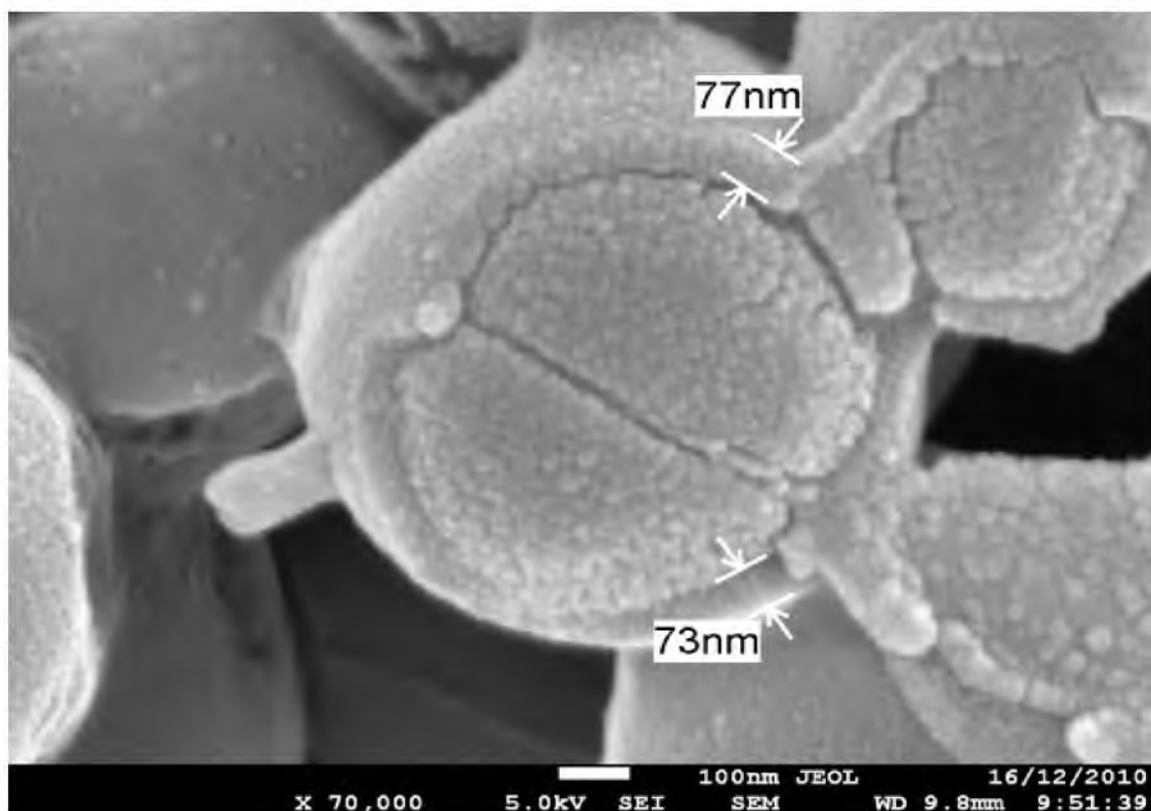
W celu dokładnej analizy zastosowano zróżnicowane powiększenia. Otrzymane obrazy powierzchni komórek, w zakresie powiększeń nawet do 70 000 razy, pozwoliły na obserwację próbek bakterii w ich naturalnym, uwodnionym stanie, co możliwe było po uprzednim ich nagłym zamrożeniu. Technika ta pozwoliła na szybkie i dokładne rejestrowanie powierzchni komórek w trzech wymiarach. Dzięki specjalnemu nożowi możliwe było przecięcie próbek i oglądanie ich przekrojów, jak również zmierzenie grubości ich ścian komórkowych. Każdy przygotowany preparat analizowano następnie w kilku obszarach, a mikrofotografie wybranych, reprezentatywnych bakterii przedstawiono poniżej.



Rys. 56. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *S. gallinarum* (fot. E. Talik).

Na dwuwymiarowym rysunku nr 56 przedstawiono fragment przełomu kolonii *S. gallinarum*, który uwidoczniał podział komórki bakteryjnej oraz ścięte fragmenty ściany komórkowej. Obraz SEM pozwolił również ocenić morfologię i wielkości badanej bakterii, które mieszczą się w granicy około 1  $\mu\text{m}$ . Stosując odpowiednie powiększenie (25 000x) i detektor elektronów wtórnych LEI uwidoczniono komórki o dość regularnych kulistych kształtach. Widoczna jest również wielowarstwowość badanej kolonii mikroorganizmów. Na mikrofotografii można zauważyć w niższej warstwie także popękane komórki bakteryjne, powstałe na skutek padającej wiązki elektronów.

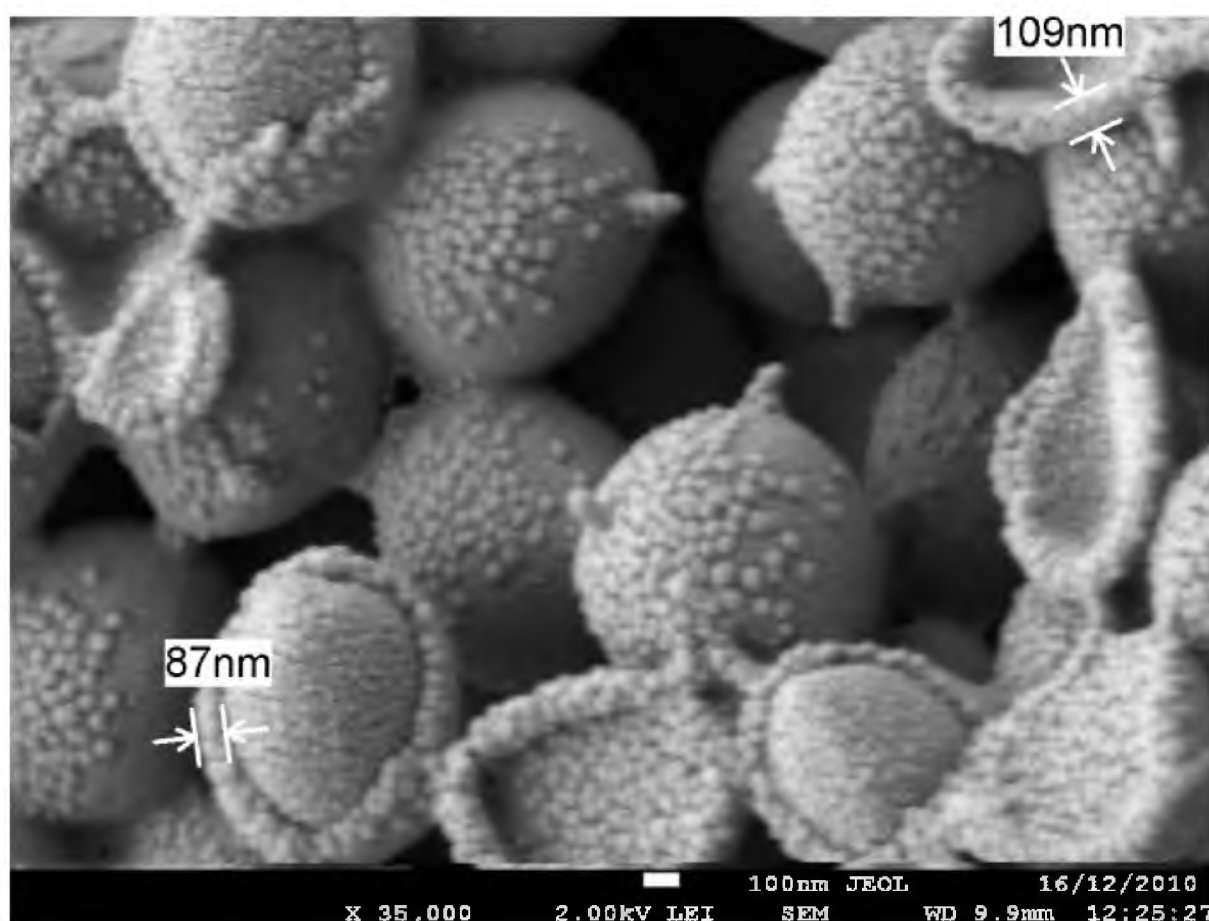
Na kolejnej mikrofotografii pokazano przykład wykorzystania programu, który umożliwia wykonanie dokładnych pomiarów wielkości oglądanych struktur (Rys. 57). Dzięki niemu wykonano pomiar grubości ściany komórkowej zamrożonej bakterii *S. xylosus*, po jej wcześniejszym przecięciu. Widoczny jest tu wyraźnie podział komórki bakteryjnej, a grubość jej ściany komórkowej wynosi około 77 nm. Uwidocznione są również ziarnistości cytoplazmy. Przyrząd ten umożliwił, zatem odwzorowanie topografii powierzchni bakterii w przestrzeni rzeczywistej, z atomową zdolnością rozdzielczą. Uzyskane powiększenie w przypadku tej bakterii wynosiło 70 000 razy, a fotografia została wykonana przy napięciu przyspieszającym 5.0 kV i z użyciem detektora elektronów wtórnych SEI.



Rys. 57. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *S. xylosus* (fot. E. Talik).

Kolejne mikrofotografie bakterii z tego gatunku, przy mniejszych powiększeniach, zebrano na rysunku numer 84. Widoczne są na nich skupiska komórek, które są wynikiem ich podziałów w wielu płaszczyznach.

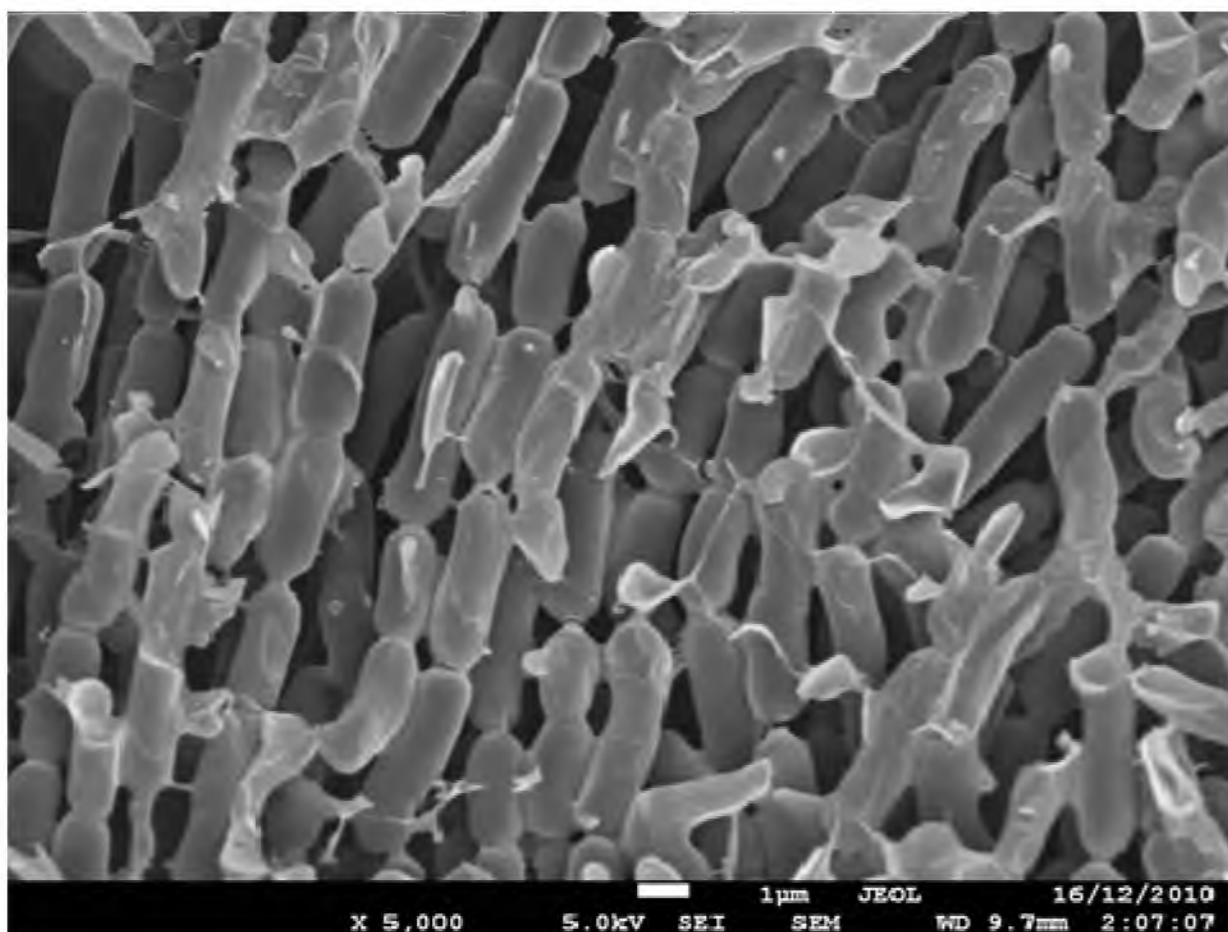
W polu widzenia mikroskopu elektronowego SEM można z największą dokładnością obserwować mikrostrukturę badanych materiałów. W przypadku bakterii *S. lentus* na ich powierzchni ujawniono dodatkowe ziarnistości znajdujące się na ścianie komórkowej, które to nie pojawiały się w dwóch pozostałych bakteriach z tego gatunku (Rys. 58). Również ze względu na te ziarnistości, grubość ich ściany komórkowej jest większa i wynosi miejscami ponad 100 nm. Zdjęcie to wykonane zostało z użyciem detektora elektronów wtórnych LEI i przy powiększeniu 35 000 razy oraz napięciu przyspieszającym 2.0 kV. Widoczne są również na nim małe wypustki, którymi najprawdopodobniej bakterie próbują się ze sobą łączyć.



Rys. 58. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *Staphylococcus lentus* (fot. E. Talik).

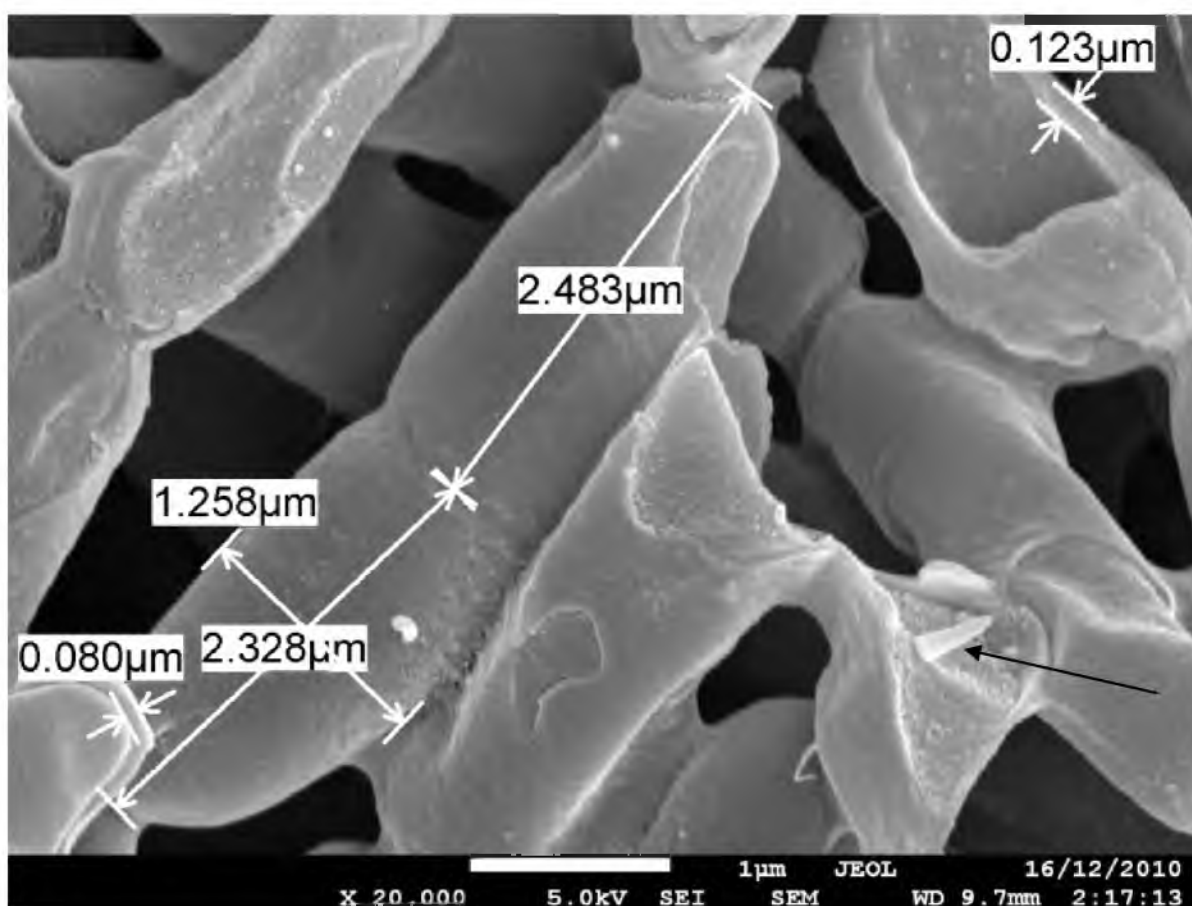
Próbki bakterii należące do rodzaju *Staphylococcus*, pochodzące z oczyszczalni ścieków są dość jednorodne i charakteryzują się zdecydowaną przewagą komórek o regularnych kulistych kształtach oraz rozmiarach mieszczących się przeważnie w przedziale jednego  $\mu\text{m}$ .

Obserwacje w mikroskopie elektronowym wykonano również dla bakterii z rodzaju *Bacillus* (Rys. 59-63). Widoczne na obrazie mikroskopowym bakterie *B. cereus* to laseczki, charakteryzujące się wydłużonym, cylindrycznym kształtem (Rys. 59). Mikrofotografię wykonano stosując powiększenie 5 000 razy, przy napięciu przyspieszającym 5.0 kV i z użyciem detektora elektronów wtórnych SEI. Przedstawia ona poglądowy widok naturalnej powierzchni kolonii, która układa się przestrzennie w formie łańcuchów. Długości poszczególnych mikroorganizmów mieszczą się w przedziale od 2 do około 5  $\mu\text{m}$ . W poszczególnych miejscach widoczny jest również ich podział.



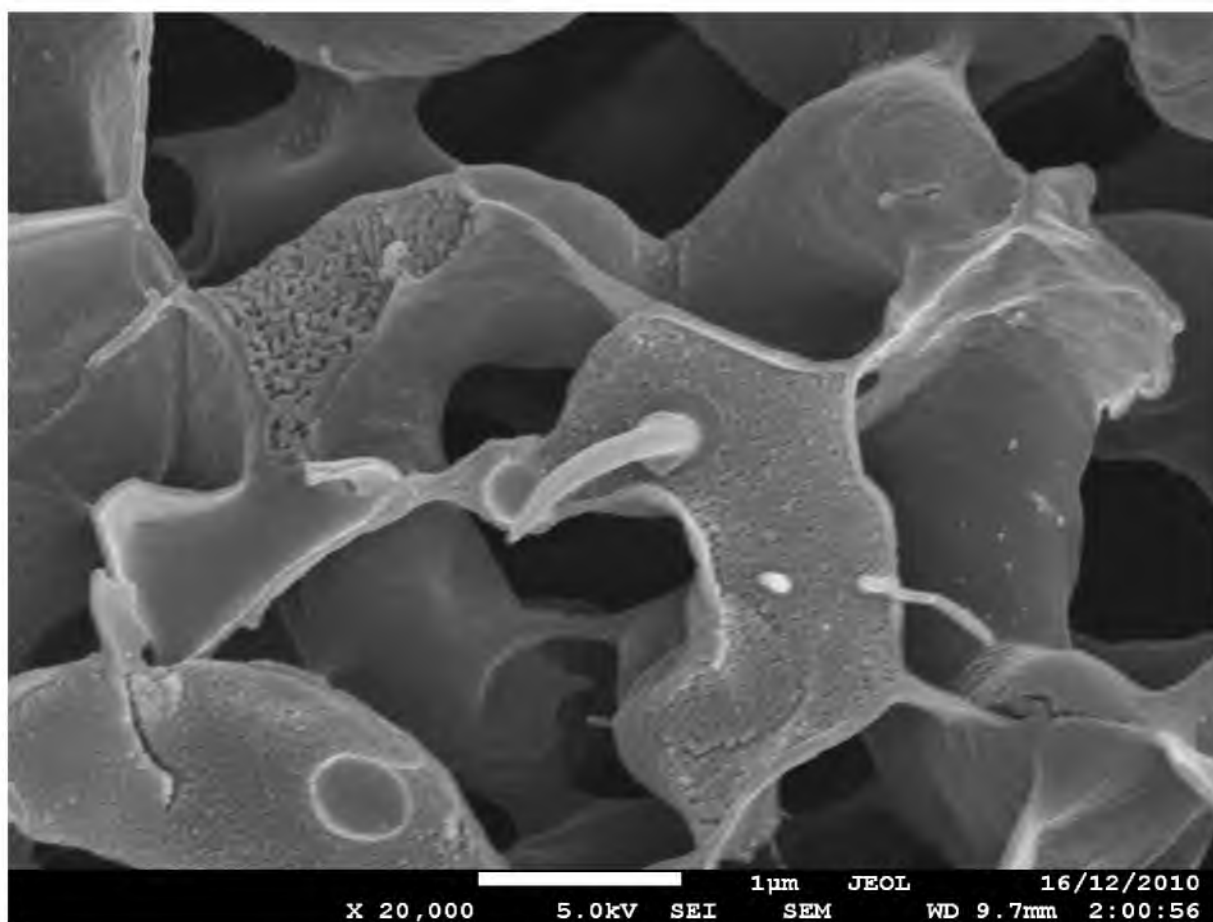
Rys. 59. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *Bacillus cereus* (fot. E. Talik).

W mikroskopie skaningowym badać można nie tylko powierzchnię preparatu, ale również jego przełom. Na kolejnej mikrofotografii, przy powiększeniu 20 000 razy, widoczne są pojedyncze laseczki *B. cereus* oraz przecięta w poprzek bakteria. Widać także podział komórki, na co wskazuje wyraźnie przewężenie, prowadzące do powstania dwóch komórek potomnych. Wykonano również pomiar długości oraz szerokości dzielących się komórek, natomiast przecięcie bakterii specjalnym nożem pozwoliło także na zmierzenie grubości ściany komórkowej, która wynosiła nieco ponad 0,100  $\mu\text{m}$ . Przy czym, niepewności pomiarowe przy oszacowaniu wielkości to około 0,05 $\mu\text{m}$ . Przekrój poprzeczny ujawnił także, dotychczas nieobserwowaną strukturę, oznaczoną czarną strzałką na obrazie, której pochodzenie jest trudne do wyjaśnienia. W celu jej zidentyfikowania potrzebne są dalsze badania. Tego rodzaju struktury podczas badań obserwowano wielokrotnie, po przecięciu próbki u bakterii z rodzaju *Bacillus* zarówno w *B. cereus* jak i *B. mycoides*.



Rys. 60. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *B. cereus* (fot. E. Talik).

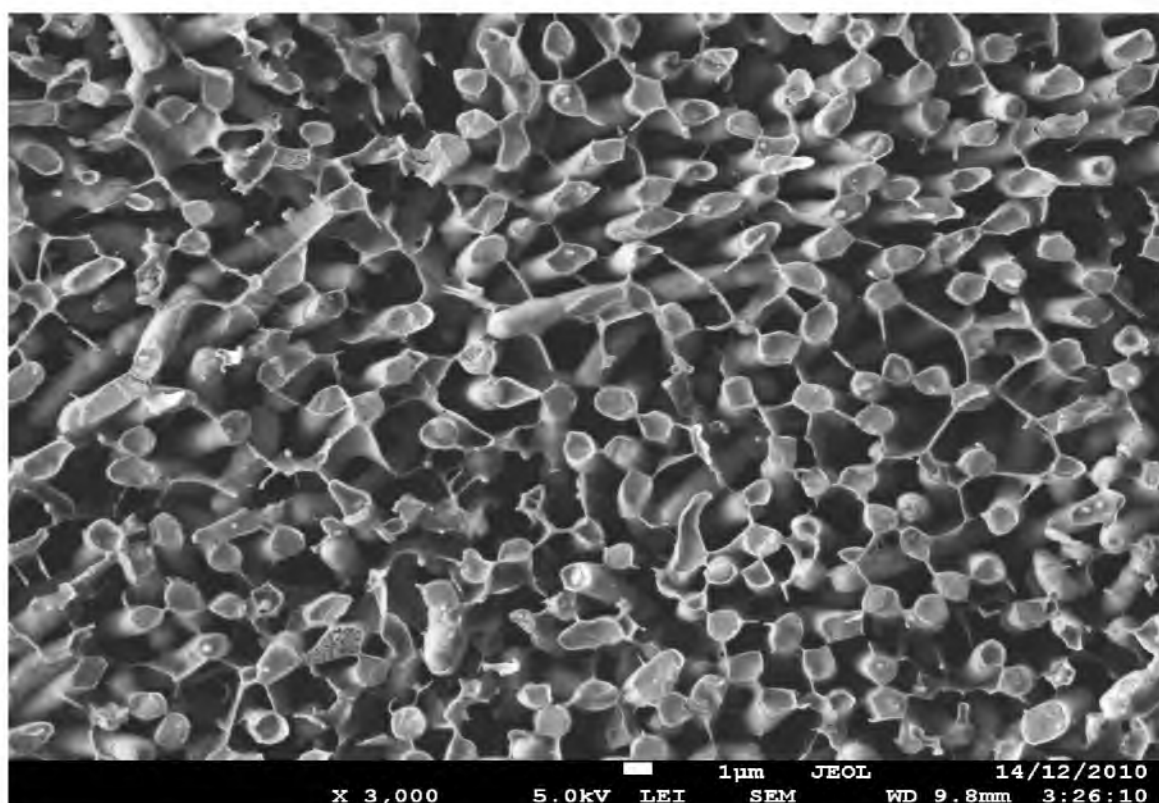
Kolejna mikrofotografia ujawnia powstałą wewnątrz komórki wydłużoną strukturę, która pojawiła się po przecięciu ostrzem bakterii *B. cereus* (Rys. 60-61). Widoczne są także dolki, które mogą być pozostałością po utworzonej przez bakterie *B. cereus* endosporze (górny prawy róg na rys. 60). Umieszczona była ona w komórce macierzystej terminalnie (biegunowo), przy czym komórka ta nie wykazywała zgrubienia, co skutkuje zachowaniem jej kształtu. Przecięta ściana komórkowa bakterii miała różną grubość (od 0,080 do 0,123  $\mu\text{m}$ ) i ujawniała również ziarnistości cytoplazmy.



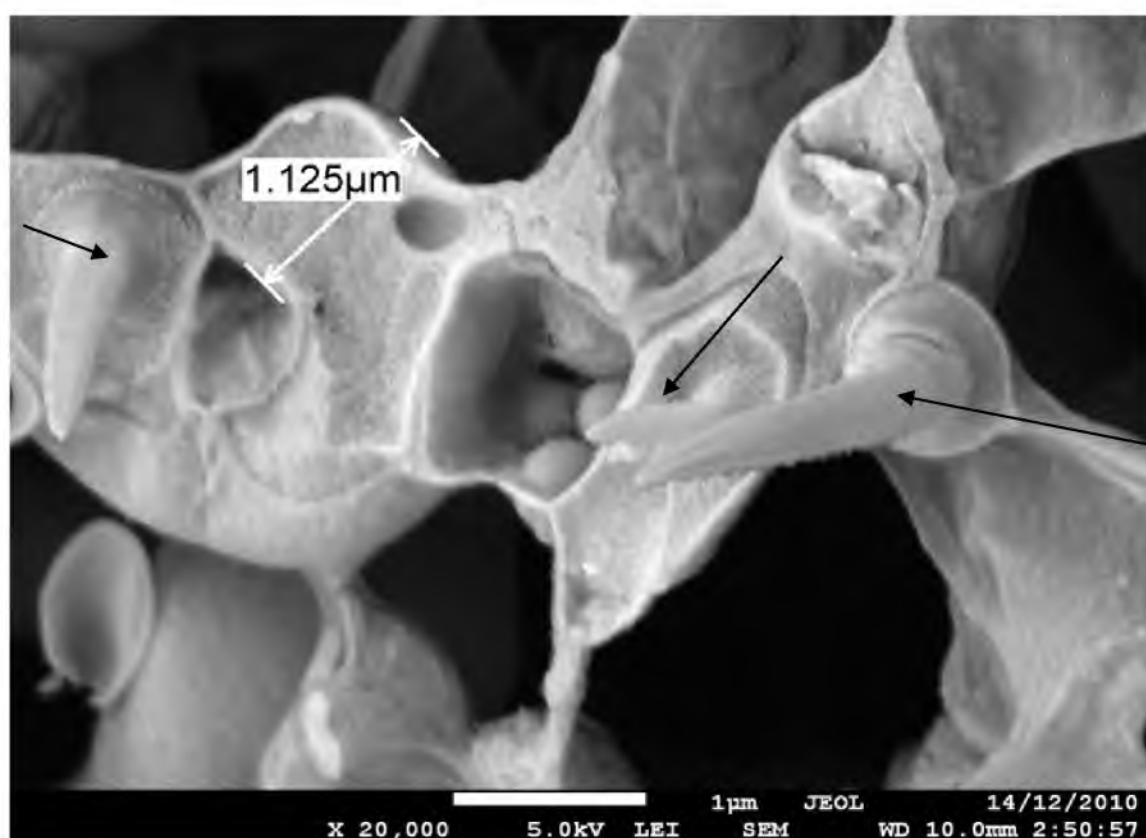
Rys. 61. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *B. cereus* (fot. E. Talik).

Otrzymano obrazy także dla bakterii *B. mycoides* (Rys. 62-63). Na zdjęciu numer 62 widoczna jest kolonia bakterii z rodzaju *Bacillus*, w której poszczególne komórki ułożone są równolegle, jedna przy drugiej. Zdjęcie to wykonano przy użyciu powiększenia 3 000 razy i detektora elektronów wtórnych LEI oraz napięcia 5.0 kV. Widoczne są również wyraźne połączenia między nimi, za pomocą cienkich linii egzopolisacharydu. Próbkę ta została przecięta i dzięki temu możemy dostrzec także przekroje poprzeczne bakterii.





Rys. 62. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *B. mycoides* (fot. E. Talik).



Rys. 63. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *B. mycoides* (fot. E. Talik).



Bardzo ciekawy obraz przedstawiony jest na mikrofotografii nr 63, wykonanej przy powiększeniu 20 000x i z użyciem detektora elektronów wtórnych LEI. Przedstawia on przecięte komórki bakterii *B. mycoides* oraz trzy niezidentyfikowane struktury, różnych wielkości, oznaczone czarnymi strzałkami. Pojawiły się one także u bakterii z gatunku *B. cereus*.

### 7.3. Wpływ temperatury na skład chemiczny i morfologię *B. subtilis* i *E. coli*

Ze względu na optymalną temperaturę wzrostu oba wybrane do badań gatunki bakterii tj. *B. subtilis* i *E. coli* klasyfikowane są jako mezofile. Temperaturą najbardziej odpowiednią do wzrostu i rozwoju tych szczepów jest temperatura wynosząca około 37°C. Istotną różnicą między tymi dwoma rodzajami bakterii jest to, iż *B. subtilis* reprezentują bakterie Gram-dodatnie, a *E. coli* bakterie Gram-ujemne. Ponadto zaletą tych szczepów jest łatwość hodowli w warunkach laboratoryjnych oraz fakt, iż są to bakterie niepatogenne.

Zarówno bakterie *E. coli* jak i *B. subtilis* hodowane w temperaturze niższej niż optymalna (20°C) rosły znacznie słabiej na przygotowanych wcześniej podłożach, co skutkowało zmniejszoną produkcją biomasy. Spowolniony za sprawą obniżonej temperatury inkubacji wzrost mikroorganizmów był widoczny w przypadku szczepów *E. coli*, jednak wyraźniej zauważalny był w przypadku hodowli bakterii *B. subtilis*. Oba przeznaczone do badań gatunki bakterii rosły na podłożach stałych w postaci kolonii gładkich, lśniących o równym brzegu i mazistej konsystencji.

Zastosowanie rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów (XPS) pozwoliło na uzyskanie przeglądowych widm powierzchniowego składu chemicznego obu szczepów bakterii, w zakresie energii od 0 do 1 400 eV. Widma te dla bakterii Gram-dodatnich *B. subtilis* i Gram-ujemnych *E. coli* hodowanych w temperaturze 37 i 20°C przedstawiono na końcu pracy (Rys. 82)

Przy analizie widm energetycznych XPS i interpretacji wyników skoncentrowano się również na wyznaczeniu pierwiastków głównych i pobocznych. Do pierwiastków głównych zaliczono te, których linie charakteryzowały się największą intensywnością. W tabeli numer 12 zamieszczono wyniki koncentracji atomowej pierwiastków dla bakterii *B. subtilis* hodowanych w różnych temperaturach. Na powierzchni mikroorganizmów z tego gatunku zdecydowanie dominował węgiel (C1s), a jego udział przekraczał udział wszystkich pozostałych pierwiastków (ponad 60%). Tlen był drugim w kolejności pierwiastkiem, przy czym u bakterii inkubowanych w warunkach optymalnej temperatury stanowił 21,95%,

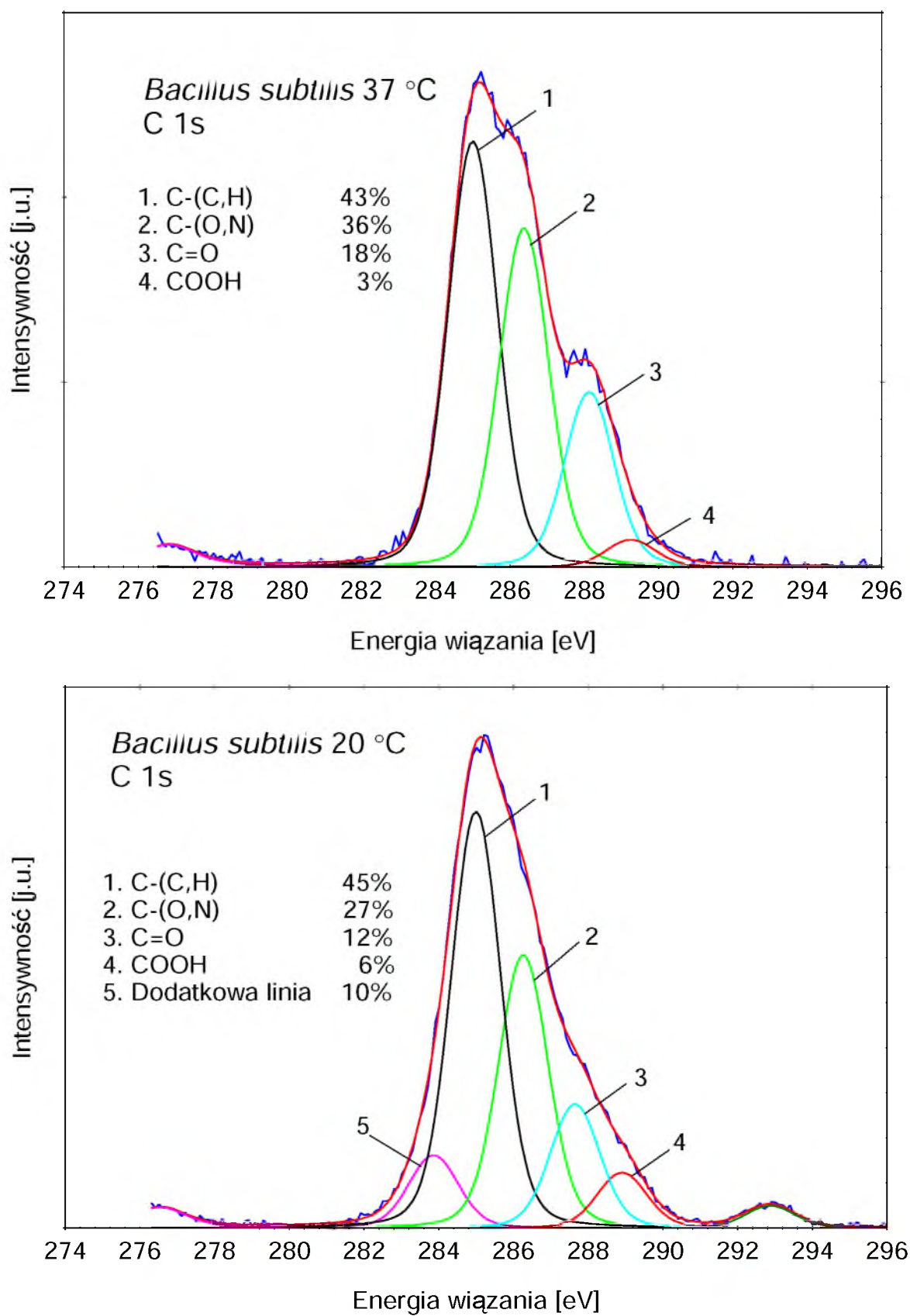
natomiast w warunkach suboptymalnych (20°C) 27,74%. W przypadku azotu (N1s) u bakterii hodowanych w temp. 37°C jego udział wynosił 12,41%, zaś w temp. 20°C spadł do 7,19%. W mniejszych ilościach natomiast występowały, przeważnie w formie zjonizowanej, takie pierwiastki jak: Na, P, Cl, S i Ca oraz Mg. W większości przypadków udział procentowy pierwiastków akcesorycznych w temperaturze 37°C był mniejszy niż w 20°C.

Tabela 12. Koncentracja atomowa pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowych struktur bakterii *B. subtilis* hodowanych w różnych temperaturach, określona metodą XPS.

Udział procentowy pierwiastków [% at.]									
Gatunek bakterii	C1s	O1s	N1s	Na1s	P2p	Cl2p	S2p	Mg2s	Ca2p3
<i>B.subtilis</i> 37°C	63,93	21,95	12,41	0,34	0,63	0,52	0,18	0,01	0,02
<i>B.subtilis</i> 20°C	61,59	27,74	7,19	1,11	1,69	0,24	0,06	0,10	0,22

Dopasowanie liniami syntetycznymi linii głównych wykrytych pierwiastków, czyli węgla (C1s), tlenu (O1s) i azotu (N1s) umożliwiło określenie grup funkcyjnych wchodzących w skład związków chemicznych budujących ściany komórkowe bakterii z rodzaju *B. subtilis* i *E. coli* oraz określenie ich intensywności w procentach, jak również wykrycie zmian, jakie zaszły w ich powierzchni na skutek różnej temperatury hodowli.

Widma szczegółowe XPS bakterii *B. subtilis* hodowanych w optymalnej temperaturze 37°C po dopasowaniu w przypadku węgla (C1s) wykazywały cztery składowe, o różnej intensywności i odmiennej energii wiązania (Rys. 64). Pierwsza linia odpowiadała wiązaniom C-C i C-H w łańcuchach alifatycznych przy 285.0 eV. Druga składowa, przesunięta względem głównej linii C1s o około  $\pm 1.8$  eV pochodziła od pojedynczych wiązań węgla z tlenem i węgla z azotem (C-O i C-N). Kolejna z kolei linia występująca w kierunku wyższych energii pochodziła od podwójnego wiązania węgla z tlenem C=O, które znajdowało się przy  $288.0 \pm 0.5$  eV. Czwarta linia to wiązanie COOH, które powstało przy najwyższej energii wiązania tj.  $289.0 \pm 0.5$  eV.

Rys. 64. Zestawienie dopasowania linii węgla C1s próbek *B. subtilis* hodowanych w temp. 37 i 20°C.

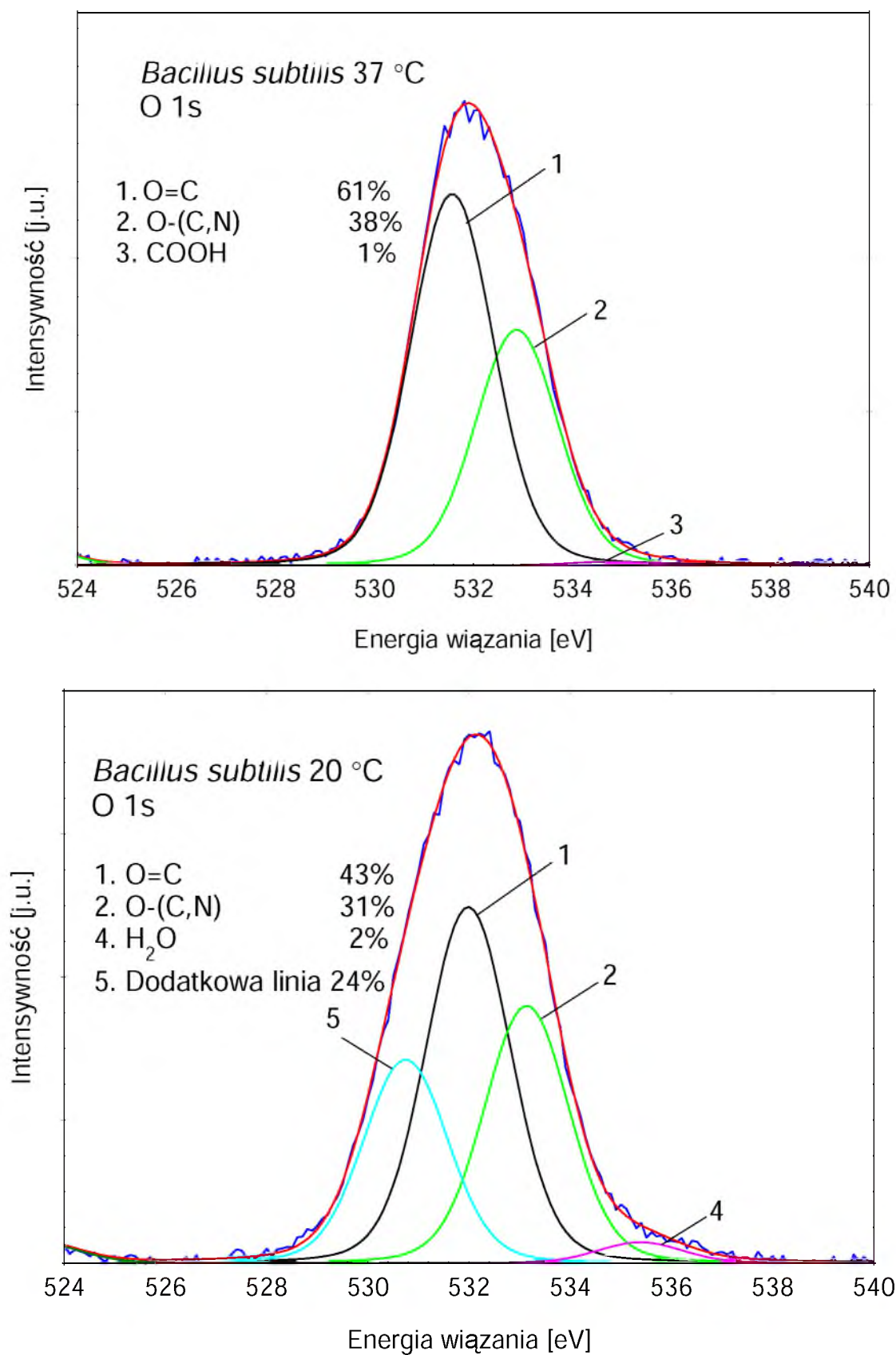
W przypadku bakterii *B. subtilis* hodowanych w temperaturze 20°C prócz powyższych czterech składników w widmie węgla, różniących się intensywnością poszczególnych wiązań, pojawiły się dodatkowe linie świadczące o tym, iż pierwiastek ten wystąpił w kilku innych połączeniach. Taka dodatkowa linia, której nie jesteśmy w stanie zidentyfikować, pojawiła się przy energii wiązania wynoszącej 283.9 eV. Traktowana jest ona, jako defekt powierzchni komórki, związany najprawdopodobniej z mniej optymalną temperaturą hodowli, a jej intensywność wyniosła aż 10%.

Wysokorozdzielcze widma linii spektralnej węgla (C1s) zostały dopasowane najmniejszą możliwą liczbą składowych. Odpowiadające im grupy funkcyjne oraz udziały w procentach zostały pokazane na rysunku nr 65. Zaobserwowano, iż w obu pikach główna składowa występująca przy energii 285.0 eV, odpowiadająca energii wiązania elektronów w węglowodorach, miała największą intensywność (43-45%). W tabeli nr 13 przedstawiono wyniki stężeń udziału poszczególnych typów wiązań, w całkowitej procentowej zawartości węgla, wykrytego za pomocą metody XPS, w badanej ścianie komórkowej bakterii. Analiza wyników wskazuje, iż w szczepach hodowanych w temperaturze optymalnej (37°C) udział wiązań C-(O, N) oraz C=O był znacznie większy w porównaniu do bakterii hodowanych w temperaturze 20°C (grupy C-(O, N) o 6,38%, a grupy C=O o 4,14%). U bakterii hodowanych w temp. 20°C zwiększył się natomiast nieznacznie udział wiązania węglowodorowego (z 27,49% w 37°C do 27,72), a także karboksylowego z 1,92% do 3,69%. W próbce tej pojawiła się również dodatkowa niezidentyfikowana linia, stanowiąca 6,16% do całkowitej zawartości wykrytego węgla w powierzchniowej warstwie bakterii *B. subtilis*.

Tabela 13. Udział poszczególnych typów wiązań w całkowitej procentowej zawartości wykrytego węgla w bakteriach *B. subtilis* hodowanych w temp. 37 i 20°C.

Sugerowane wiązanie	(1) C-(C, H)/C	(2) C-(O, N)/C	(3) C=O/C	(4) COOH/C	(5) Dodatkowa linia/C
<i>B. subtilis</i> 37°C	27,49	23,01	11,51	1,92	-
<i>B. subtilis</i> 20°C	27,72	16,63	7,39	3,69	6,16

Kolejnym składnikiem głównym, zidentyfikowanym w badanych bakteriach i zasługującym na omówienie, jest pik zmierzony w zakresie energii odpowiadającej linii 1s tlenu (Rys. 65).

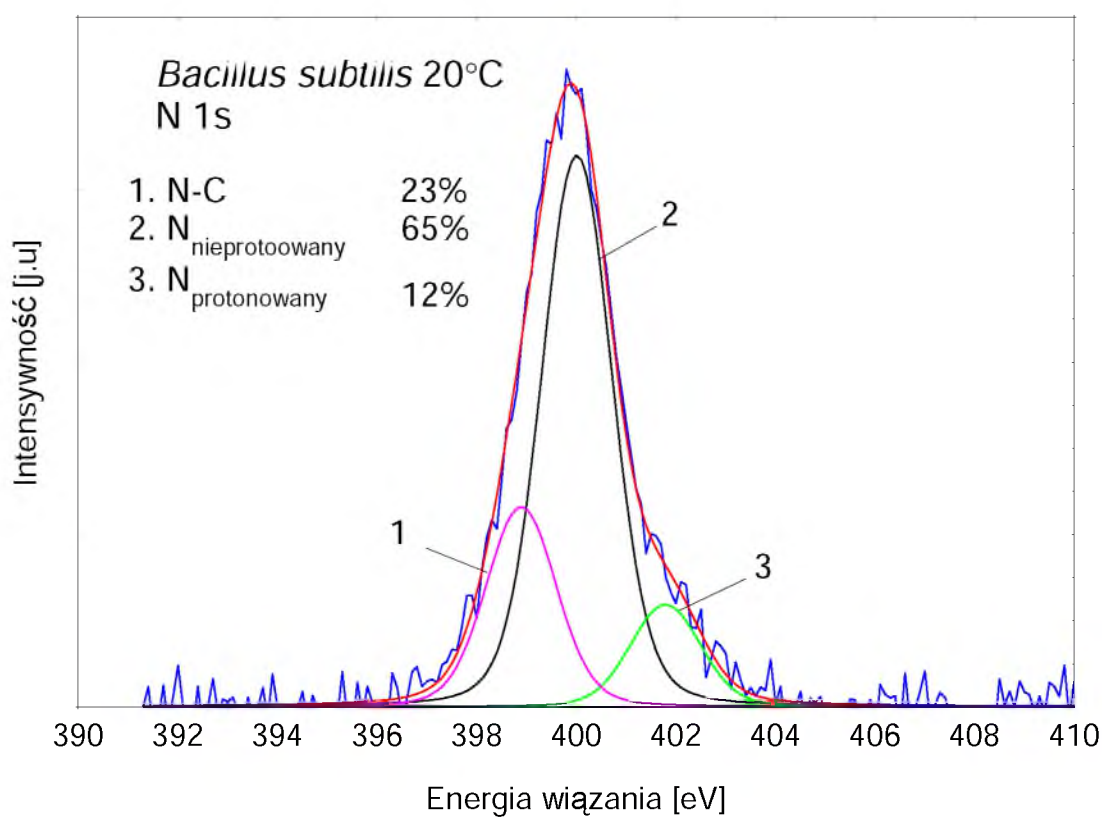
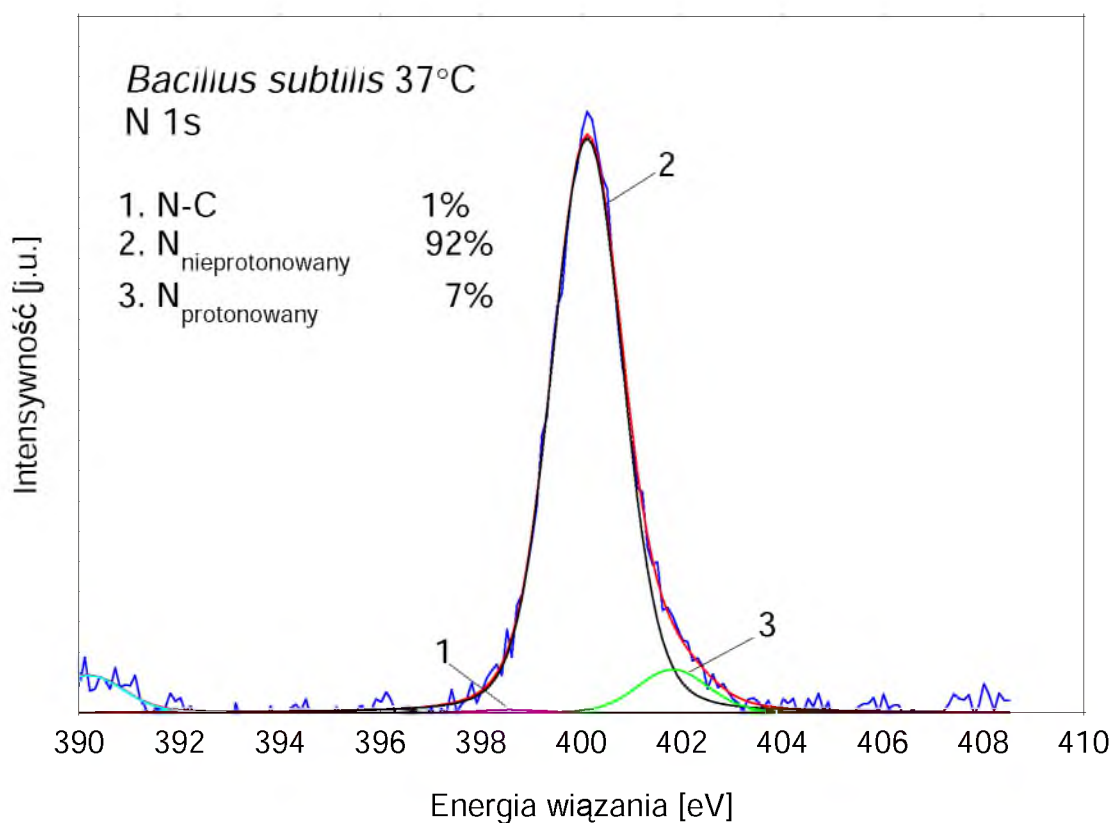
Rys. 65. Zestawienie dopasowania linii O1s próbek *Bacillus subtilis* hodowanych w temp. 37 i 20°C.

Po rozseparowaniu linii O1s bakterii *B. subtilis* ustalono, iż składa się ona, podobnie jak węgiel, z wielu związków chemicznych, o czym świadczy podział na kilka singletowych linii (dopasowanie 3, 4 składowymi). W wyniku analizy stwierdzono, iż pierwsza z tych linii u bakterii hodowanych w optymalnej temperaturze 37°C, o najmniejszej energii wiązania, tj.  $531.6 \pm 0.4$  eV, pochodziła od podwójnego wiązania tlenu z atomem węgla O=C. Intensywność tego wiązania wynosiła 61%, a udział tej linii do całkowitej powierzchni pików tlenu w mierzonej próbce wynosił 13,39% (Tab. 14). Następną linią została utworzona przez fotoelektrony pochodzące od tlenu związanego pojedynczo z węglem lub azotem O-(C, N). Występowała ona (2) przy wyższych energiach wiązania, około  $533.0 \pm 0.4$  eV. Kolejna, trzecia linia pochodziła od grupy COOH i pojawiła się przy energii równej 534.7 eV. W próbce bakterii *B. subtilis* hodowanych w temperaturze 20°C wiązania tego nie zaobserwowano, natomiast pojawiła się w kierunku wyższych energii wiązania woda (535.4 eV) oraz dodatkowa linia o dość dużej intensywności bo 24% przy 530.8 eV.

Udział poszczególnych typów wiązań w całkowitej procentowej zawartości tlenu (Tab. 14) ujawnił w próbce hodowanej w 20°C pojawienie się dodatkowego niezidentyfikowanego wiązania. Jego intensywność wynosiła 24%, czyli wiązanie to stanowiło 6,66% wartości w stosunku do wykrytego w próbce za pomocą XPS całkowitego tlenu. Znajdowała się w próbce tej również akcesoryczna ilość wody (0,55%). Zmalał natomiast udział wiązania O=C (z 61% do 43%), czyli z 13,39 do 11,93 oraz wiązania karboksylowego, które nie pojawiło się nawet w śladowych ilościach w widmie XPS rejonu tlenu (O1s), w hodowli prowadzonej w suboptymalnej temperaturze wzrostu (20°C).

Tabela 14. Udział poszczególnych typów wiązań w całkowitej procentowej zawartości wykrytego tlenu w próbkach *B. subtilis* hodowanych w temp. 37 i 20°C.

Sugerowane wiązanie	(1) O=C/O	(2) O-(C, N)/O	(3) COOH/O	(4) H <sub>2</sub> O/O	(5) Dodatkowa linia/O
<i>B. subtilis</i> 37°C	13,39	8,34	0,22	-	-
<i>B. subtilis</i> 20°C	11,93	8,60	-	0,55	6,66

Rys. 66. Zestawienie dopasowania linii N1s próbek *B. subtilis* hodowanych w temp. 37 i 20°C.

Analiza linii azotu (N1s) u bakterii z gatunku *B. subtilis* hodowanych na podłożu TSA w odmiennych temperaturach wykazała, że rozkładały się one na trzy składowe (Rys. 66). Na widmie wysokiej rozdzielczości, po ich dopasowaniu uwidoczniają się dwie linie o małej intensywności oraz jedna o znacznie większej. Pierwsza z nich, o najmniejszej energii wiązania (około  $398.5 \pm 0.6$  eV), została utworzona przez fotoelektrony pochodzące od azotu związanego pojedynczym wiązaniem z węglem (N-C). Jej intensywność wynosiła zaledwie 1% w temperaturze 37°C, zaś w temperaturze 20°C wzrosła do 23%. Największa z linii znajdowała się przy energii wiązania  $400.1 \pm 0.3$  eV i zawierała nieprotonowaną grupę aminową. Stanowiła ona u bakterii hodowanych w 37°C, aż 92% intensywności, a u bakterii hodowanych w suboptymalnych warunkach temperaturowych 65%. Ostatnia z linii, znajdująca się przy największej energii wiązania wynoszącej  $401.8 \pm 0.2$  eV pochodziła od sprotonowanej grupy aminowej, a jej intensywność z 7% w temperaturze 37°C wzrosła do 12% w temperaturze 20°C.

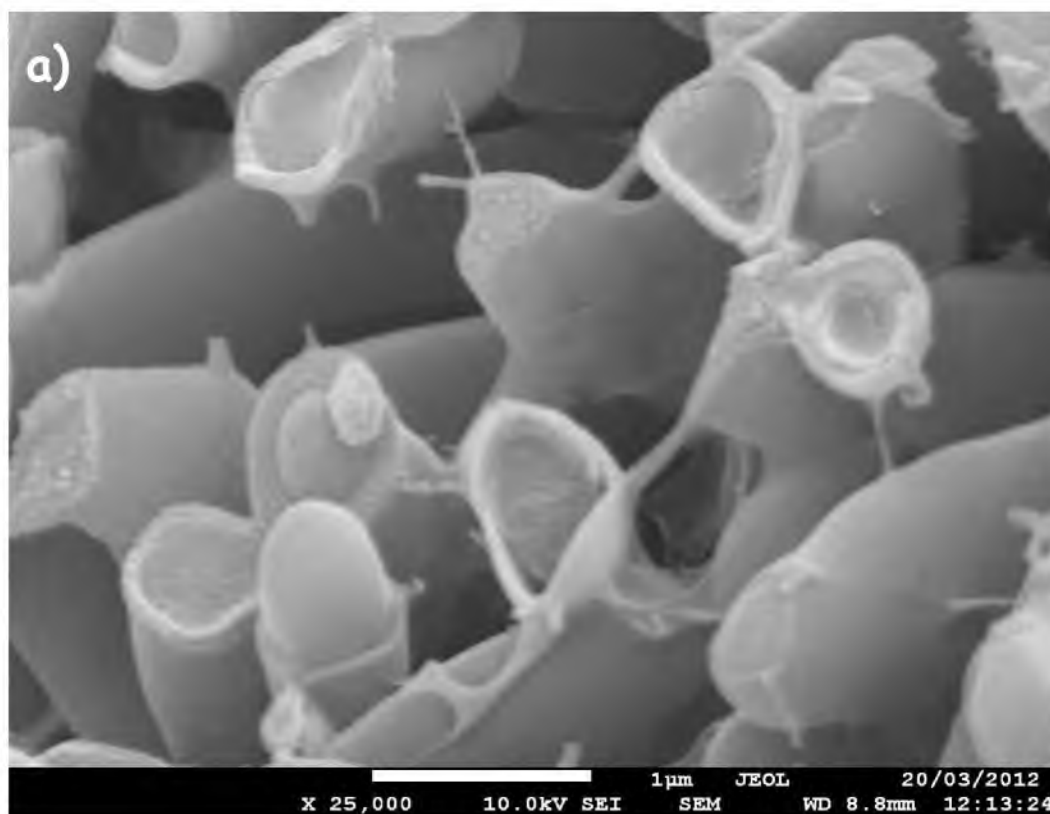
Uzyskane wyniki z dopasowania widm i odpowiadającymi im grupami funkcyjnymi zestawiono w tabeli nr 15.

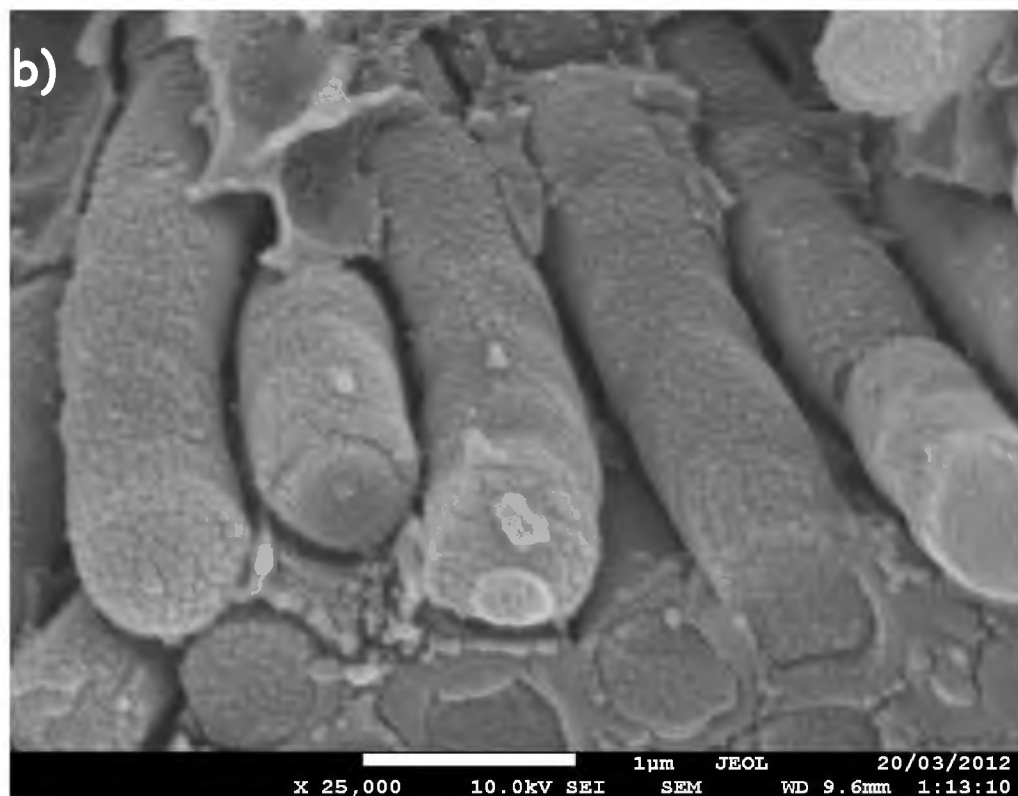
Tabela 15. Zestawienie wyników analizy XPS bakterii z rodzaju *Bacillus* hodowanych w temp. 37 i 20°C.

Próbka	<i>Bacillus subtilis</i> 37°C			<i>Bacillus subtilis</i> 20°C		
	Sugerowane wiązanie	Energia wiązania [eV]	I %	Sugerowane wiązanie	Energia wiązania [eV]	I %
<b>C1s</b>				Dodatkowa linia	283.9	10
	C-(C, H)	285.0	43	C-(C, H)	285.0	45
	C-(O, N)	286.4	36	C-(O, N)	286.3	27
	C=O	288.1	18	C=O	287.7	12
	COOH	289.3	3	COOH	288.9	6
<b>O1s</b>				Dodatkowa linia	530.8	24
	O=C	531.6	61	O=C	532.0	43
	O-(C, N)	532.9	38	O-(C, N)	533.1	31
	COOH	534.7	1			
				H <sub>2</sub> O	535.4	2
<b>N1s</b>	N-C	398.6	1	N-C	398.9	23
	N <sub>nieprotonowany</sub>	400.1	92	N <sub>nieprotonowany</sub>	400.0	65
	N <sub>protonowany</sub>	401.8	7	N <sub>protonowany</sub>	401.8	12



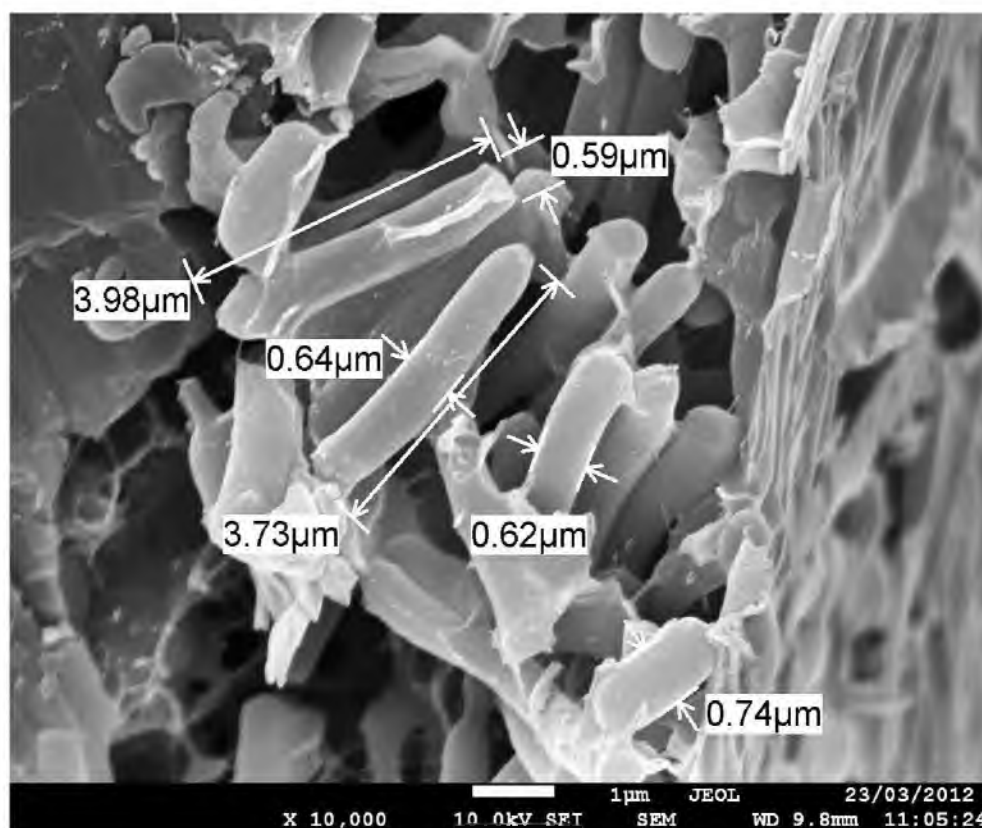
Przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego i przystawki Cryo wykonano mikrofotografie zamrożonych bakterii. Obserwacje przy mniejszych i większych powiększeniach oraz bezkonkurencyjna głębia ostrości SEM pozwoliły na uzyskanie informacji o ich strukturze powierzchniowej. Preparaty uwidaczniały wyraźne różnice w topografii ich powierzchni. Na obrazie przedstawiającym bakterie *B. subtilis*, które były hodowane przez 24 godziny w 37°C (Rys. 67a) i przy użytym powiększeniu 25 000x widoczna była ich gładka powierzchnia. U bakterii inkubowanych w temperaturze 20°C (Rys. 67b), ta powierzchnia była bardziej chropowata i obecne były na niej wyraźne granule.



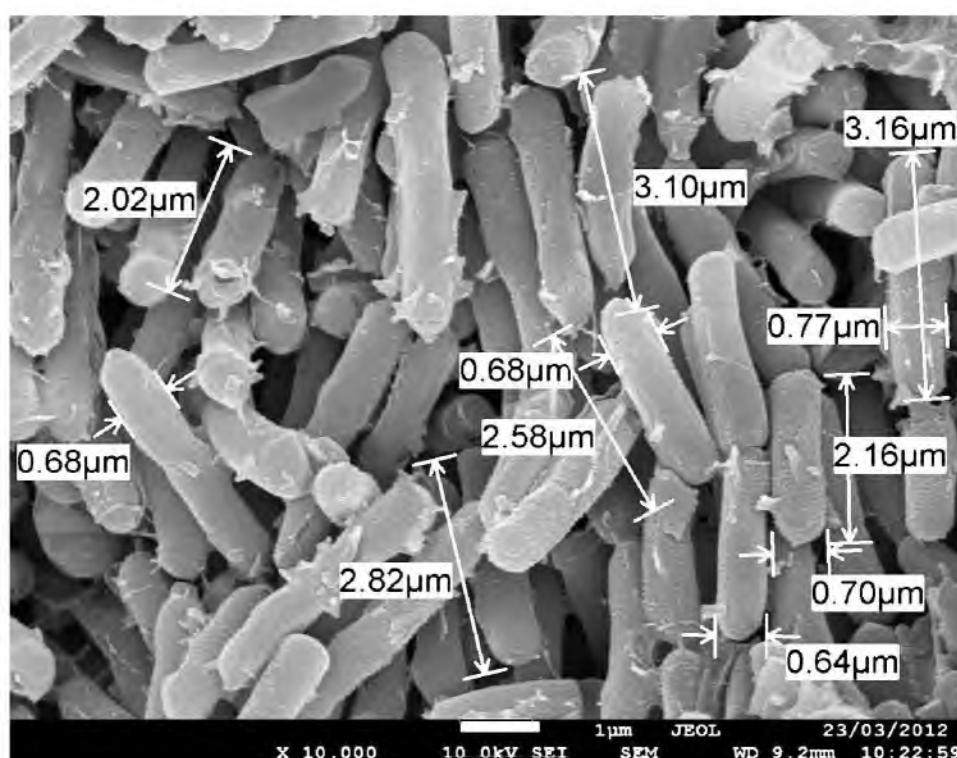


Rys. 67. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *B. subtilis*: a) 37°C, b) 20°C (powiększenie 25 000x) (fot. E. Talik).

Otrzymane obrazy SEM pozwoliły również na określenie wielkości badanych laseczek *Bacillus*. Długości komórek *B. subtilis*, hodowanych w optymalnej temperaturze (37°C) przez 24 godziny mieściły się w granicy 3,8 μm, przy grubości około 0,6 μm (Rys. 68). U bakterii hodowanych w temperaturze suboptymalnej (20°C), przez ten sam okres czasu, długość komórek uległa zmniejszeniu o mniej więcej 1 μm, zaś ich grubość wzrosła o 0,3 μm (Rys. 69). Średnia ich długość wynosiła zatem niecałe 3 μm, a grubość 0,9 μm. Niepewność pomiarową dla wszystkich wielkości mierzonych oszacowano natomiast na 0,05 μm.



Rys. 68. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *B. subtilis* hodowanych przez 48 godzin w temperaturze 37°C (powiększenie x 10 000; fot. E. Talik).



Rys. 69. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *B. subtilis* hodowanych przez 48 godzin w temperaturze 20°C (powiększenie x 10 000; fot. E. Talik).

W ramach pomiarów XPS bakterii Gram-ujemnych z gatunku *E. coli* otrzymano również pełne widma przeglądowe, na których występujące linie spektralne odwzorowują energię wiązania na poszczególnych powłokach elektronowych pierwiastków. Pozwoliło to na pełną ich analizę jakościową i ilościową, poprzez wyznaczenie składu pierwiastkowego i pomiar natężenia fotoelektronów inkubowanych w różnych temperaturach szczepów bakterii *E. coli*. Widma te zestawiono na końcu pracy (Rys. 81), a obliczone wartości stężeń atomowych zestawiono w tabeli nr 16. Zawarty w niej skład pierwiastkowy oraz procentowa ich ilość w warstwie powierzchniowej badanych bakterii pozwoliła ustalić, iż takie pierwiastki jak węgiel, tlen i azot stanowią ponad 98% składu próbki i to one składają się na podstawowy budulec zewnętrznej warstwy tych drobnoustrojów. Zawartość azotu jest tu stosunkowo niska w porównaniu do bakterii Gram-dodatnich, natomiast udział tlenu jest dosyć wysoki. Analiza widm uzyskanych z wykorzystaniem XPS umożliwiła także wykrycie licznych, pozostałych pierwiastków w próbkach, które występowały w ilościach śladowych (do 0,01%). Były to m.in. Na, P, Si, Cl, S, Ca, Mg oraz Al, które stanowiły mniej niż 2% ich składu całkowitego.

Tabela 16. Koncentracja atomowa pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowych struktur bakterii *E. coli* hodowanych w temp. 37 i 20°C określona metodą XPS.

Udział procentowy pierwiastków [% at.]											
Gatunek bakterii	C1s	O1s	N1s	Na1s	P2p	Si2p	Cl2p	S2p	Mg2s	Ca2p3	Al2p
<i>E. coli</i> 37°C	66,24	27,07	4,96	0,42	0,34	0,09	0,45	0,28	0,01	0,06	0,08
<i>E. coli</i> 20°C	67,99	25,99	4,44	0,25	0,42	0,28	0,17	0,17	0,12	0,11	0,07

W oparciu o znajomość udziału procentowego zidentyfikowanych pierwiastków głównych i pobocznych u *E. coli*, dokonano, jak dla poprzednich próbek, dopasowania liniami syntetycznymi linii, które charakteryzowały się największą intensywnością, tj. węgla (C1s), tlenu (O1s) oraz azotu (N1s). Analiza kształtu poszczególnych linii XPS umożliwiła rozróżnienie stanów elektronowych pierwiastków oraz udziały poszczególnych wiązań w związku z ich otoczeniem chemicznym. Zidentyfikowano, tym samym, grupy funkcyjne wchodzące w skład związków chemicznych budujących ściany komórkowe bakterii z rodzaju *E. coli* oraz określono ich intensywności w procentach.

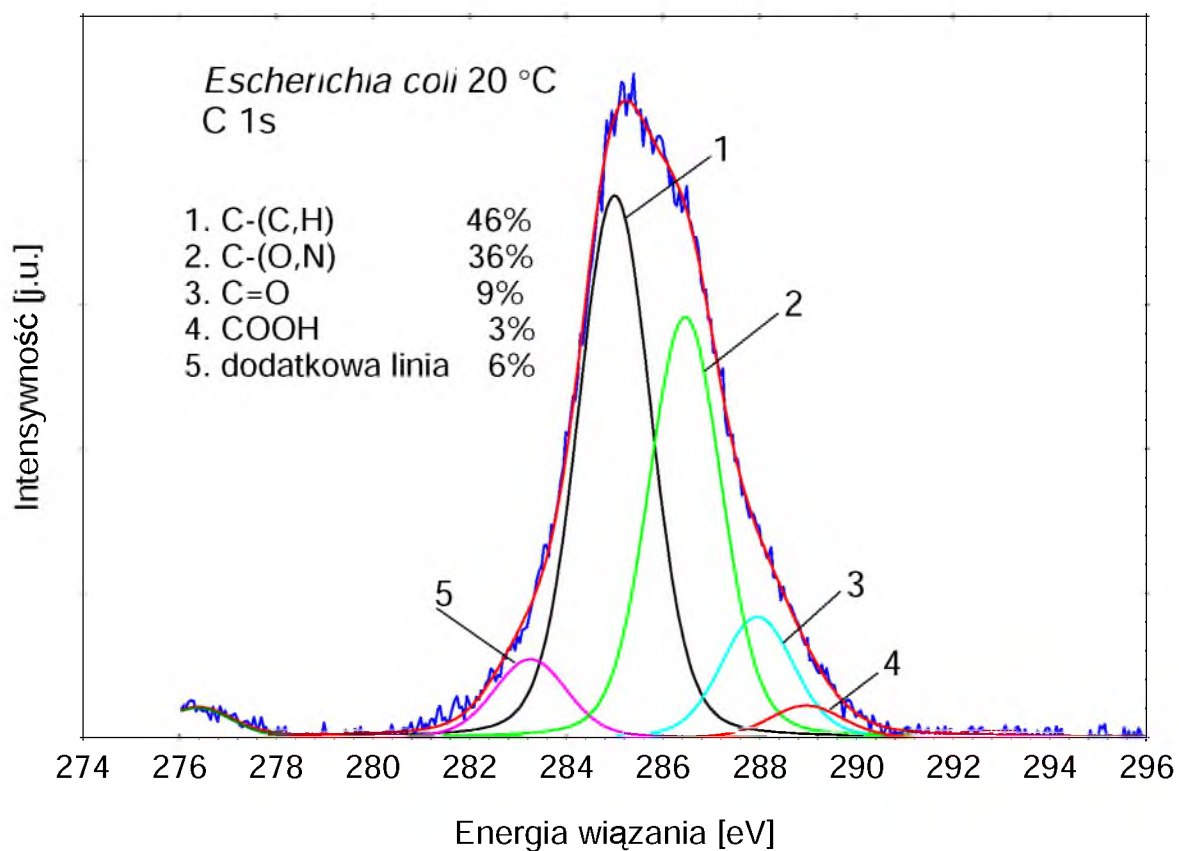
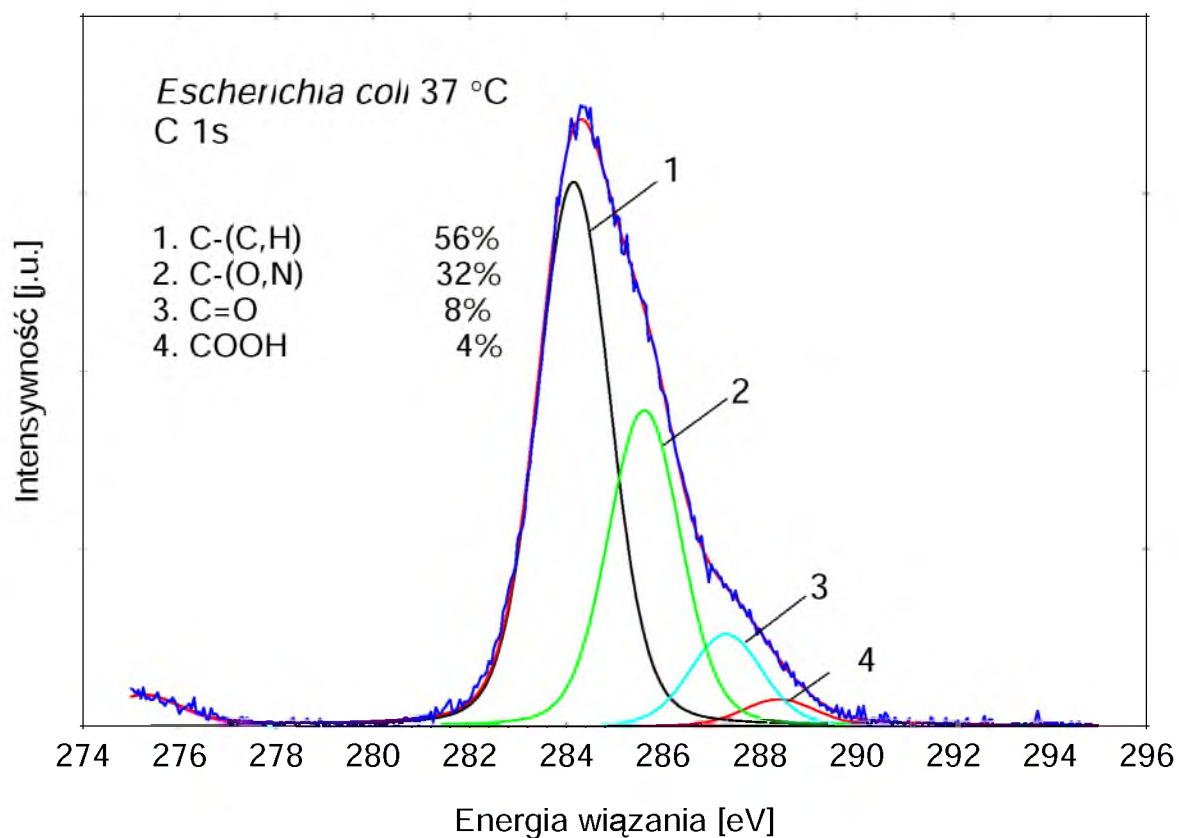
Tabela numer 17 zawiera wszystkie wyniki uzyskane dla głównych linii pierwiastków

bakterii jelitowych hodowanych w różnych temperaturach. Zamieszczone są w niej połączenia chemiczne, w których uczestniczył dany pierwiastek, wraz z podaną energią wiązania i intensywnością w procentach.

Tabela 17. Wyniki występowania C1s, O1s i N1s w różnych połączeniach chemicznych oraz ich intensywności dla badanych próbek *E. coli* hodowanych w odmiennych temperaturach.

Próbka	<i>Escherichia coli</i> 37°C			<i>Escherichia coli</i> 20°C		
	Sugerowane wiązanie	Energia wiązania [eV]	I %	Sugerowane wiązanie	Energia wiązania [eV]	I %
C1s				Dodatkowa linia	283.3	6
	C-(C, H)	285.0	56	C-(C, H)	285.0	46
	C-(O, N)	286.5	32	C-(O, N)	286.5	36
	C=O	288.4	8	C=O	288.2	9
	COOH	289.3	4	COOH	289.0	3
O1s				Dodatkowa linia	530.0	5
	O=C	531.5	16	O=C	531.7	32
	O-(C, N)	532.9	72	O-(C, N)	533.0	60
	COOH	534.1	12	COOH	534.9	3
N1s	N-C	-	-	N-C	398.7	19
	N <sub>nieprotonowany</sub>	400.3	86	N <sub>nieprotonowany</sub>	400.2	70
	N <sub>protonowany</sub>	401.8	14	N <sub>protonowany</sub>	401.5	11

Widma szczegółowe XPS bakterii hodowanych w optymalnej temperaturze 37°C dla linii węgla, w mniejszym zakresie energii wiązania, wskazywały cztery podstawowe składowe. Przy energii wiązania 285.0 eV widoczna była linia związana z obecnością na powierzchni próbki pojedynczych wiązań C-C i C-H w łańcuchach alifatycznych. Kolejna linia pochodziła od pojedynczych wiązań węgla z tlenem i węgla z azotem (C-O i C-N), mająca swoje maksimum przy energii wiązania  $286.5 \pm 0.5$  eV. Trzecia linia pochodziła od podwójnego wiązania węgla z tlenem C=O, które znajduje się przy  $288.0 \pm 0.5$  eV. Ostatnia linia, która pojawiła się przy najwyższej energii wiązania  $289.0 \pm 0.5$  eV odpowiadała grupie karboksylowej COOH. W przypadku bakterii hodowanych w temperaturze 20°C prócz powyższych czterech składników, pojawiła się dodatkowa linia o dość niskiej energii wiązania równej 283.3 eV i intensywności 6%.

Rys. 70. Zestawienie dopasowania linii C1s u bakterii *E. coli* hodowanych w temp. 37 i 20°C.

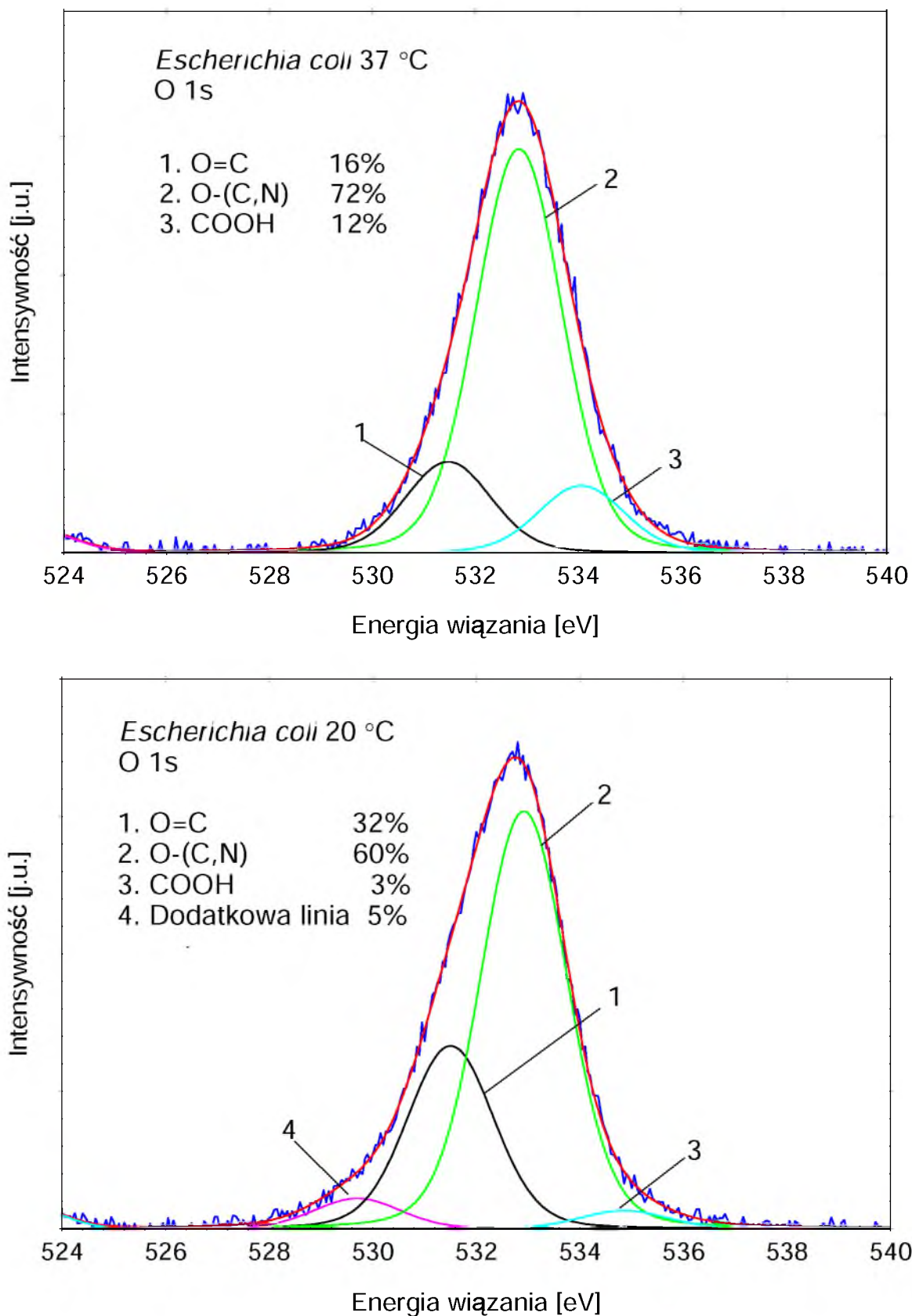
W tabeli nr 18, z uzyskanych wyników dopasowania piku C1s zamieszczono obliczony udział poszczególnych typów wiązań w całkowitej procentowej zawartości węgla, wykrytego w badanej ścianie komórkowej bakterii *E. coli* za pomocą XPS. Analizując otrzymane wyniki widzimy, iż w szczepach hodowanych w temperaturze 37°C dominowało wiązanie C-(C, H) i stanowiło ono wartość 37,09% w stosunku do całkowitego węgla, przy czym u tych bakterii udział wiązania węglowodorowego jest większy o 10% w temperaturze optymalnej, w stosunku do udziału tego wiązania na powierzchni komórek hodowanych w temp. 20°C (Rys. 70). Nieznacznie zwiększył się natomiast udział wiązania C-(O,N) i C=O w porównaniu do bakterii hodowanych w temp. 37°C. U mikroorganizmów hodowanych w obu temperaturach pojawiło się wiązanie karboksylowe w bardzo podobnej wartości, natomiast jak w przypadku *B. subtilis* w hodowli prowadzonej w temperaturze suboptymalnej 20°C pojawiła się dodatkowa linia, tutaj stanowiąca 6% intensywności, czyli 4,08% z całości wykrytego w próbce węgla.

Tabela 18. Udział poszczególnych typów wiązań w związkach do całkowitej zawartości wykrytego węgla w próbkach *E. coli* hodowanych w temp. 37 i 20°C

Sugerowane wiązanie	(1) C-(C, H)/C	(2) C-(O, N)/C	(3) C=O/C	(4) COOH/C	(5) Dodatkowa linia/C
<i>E. coli</i> 37°C	37,09	21,20	5,30	2,65	-
<i>E. coli</i> 20°C	31,28	24,48	6,12	2,04	4,08

Z analizy szczegółowego widma piku tlenu (O1s) wynika natomiast, iż składa się on z kilku związków chemicznych, gdyż dzieli się na 3 singletowe linie (Rys. 71). Pierwsza z linii wykrytych u bakterii z rodzaju *E. coli* przy energii wiązania  $531.2 \pm 0.5$  eV, pochodziła od podwójnego wiązania tlenu z węglem O=C, gdzie jej wartość z 16% u bakterii hodowanych w optymalnej temperaturze, wzrosła dwukrotnie (do 32%) u bakterii hodowanych w 20°C. Następna linia została utworzona przez fotoelektrony pochodzące od tlenu związanego pojedynczo z węglem lub azotem O-(C, N). Wystąpiła ona przy energii  $533.0 \pm 0.3$  eV, a jej intensywność w obu próbkach przekraczała znacznie pozostałe (72% w 37°C i 60% w 20°C). Kolejna linia pochodziła od grupy COOH i pojawiła się przy energii wiązania 534.1 eV w intensywności 12%, w hodowli prowadzonej w optymalnych warunkach temperaturowych. W próbce hodowanej w temperaturze 20°C wiązanie to miało intensywność 3% przy położeniu 534.9 eV. Interesująca obserwacja dotyczyła jednak pozycji

piku przy energii wiązania 530.0 eV w temp. 20°C, gdzie pojawiła się dodatkowa linia o intensywności 5%.



Rys. 71. Zestawienie dopasowania linii O1s u bakterii *E. coli* hodowanych w temp. 37 i 20°C.

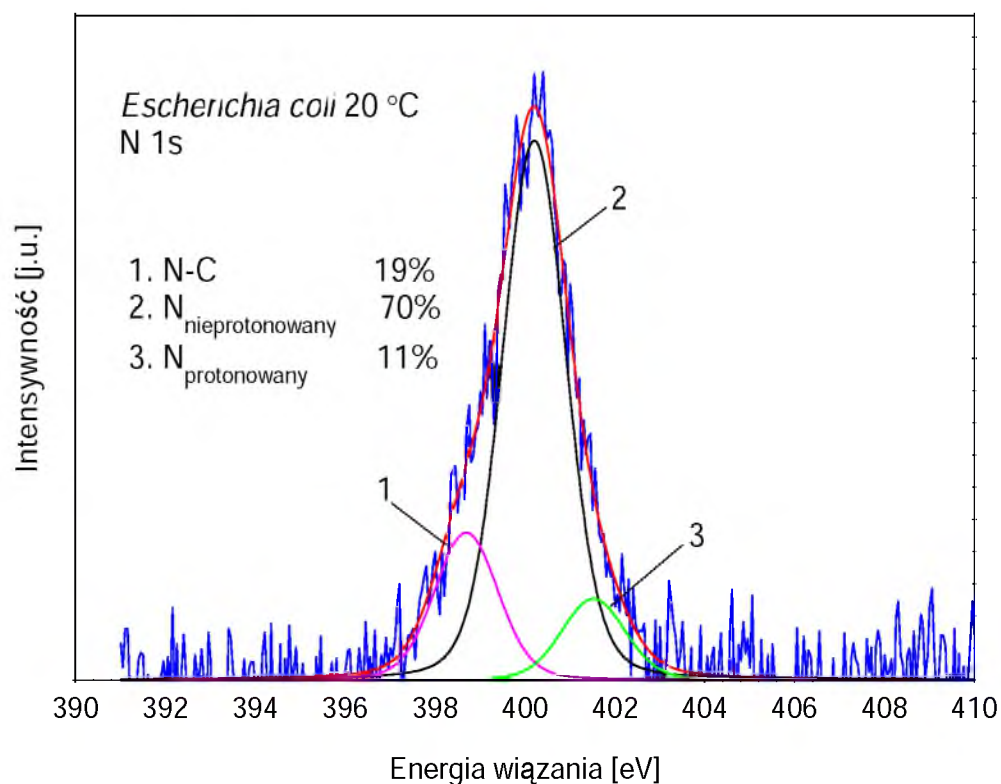
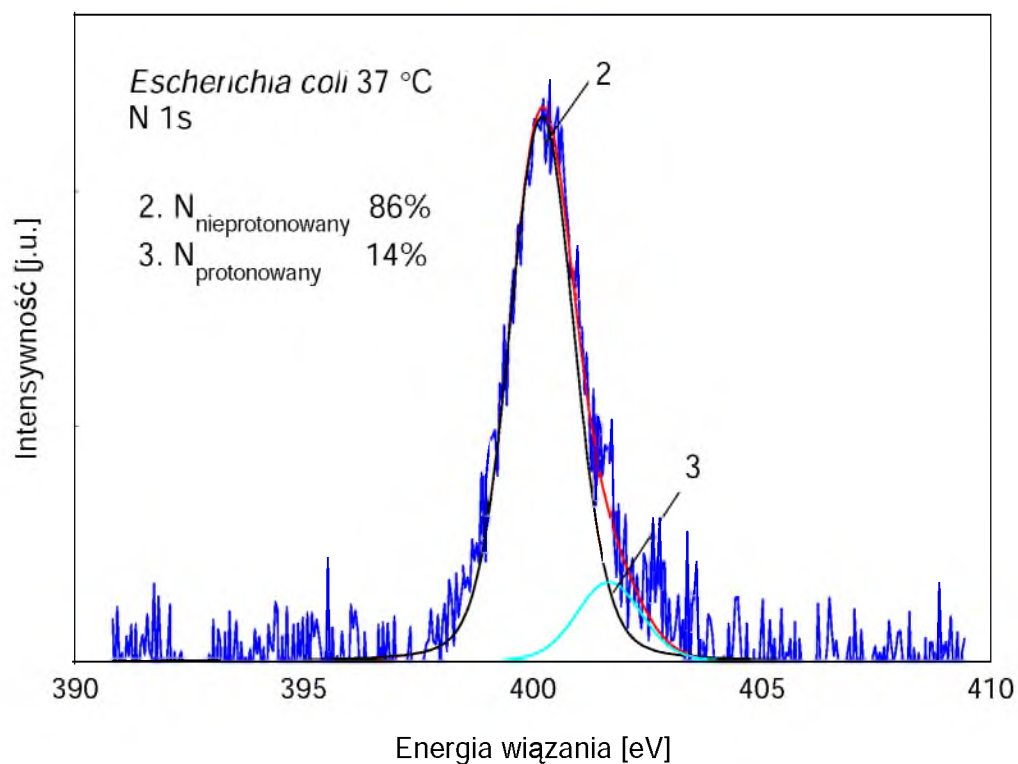


Obliczenie zawartości poszczególnych typów wiązań w stosunku do całkowitej koncentracji tlenu w próbkach miało za zadanie zobrazowanie zmienności występowania poszczególnych grup funkcyjnych danego pierwiastka w zależności od temperatury inkubacji. Stwierdzono, że w komórkach bakterii *E. coli* zawartość wiązania O=C w stosunku do całkowitego wykrytego tlenu w 20°C była prawie dwukrotnie wyższa w porównaniu do jego zawartości w komórkach inkubowanych w temperaturze optymalnej dla tych bakterii (8,32% w stosunku do 4,33%). W próbkach tego gatunku, w przypadku linii tlenu, dominującą grupą było pojedyncze wiązanie tlenu z węglem lub tlenu z azotem w obu temperaturach hodowli. Tutaj również w temp. 20°C w badanych komórkach pojawiło się dodatkowe, niezidentyfikowane wiązanie, wynoszące 1,30%. Grupa COOH w stosunku do całkowitej zawartości tlenu w temp. 37°C u *E. coli* stanowiła 3,25%, natomiast jej zawartość spadła do 0,78% w temperaturze 20°C.

Tabela 19. Zawartość poszczególnych typów wiązań w związkach do całkowitej procentowej zawartości wykrytego tlenu w próbkach *E. coli* hodowanych w temp. 37 i 20°C.

Sugerowane wiązanie	(1) O=C/O	(2) O-(C, N)/O	(3) COOH/O	(5) Dodatkowa linia/O
<i>E. coli</i> 37°C	4,33	19,49	3,25	-
<i>E. coli</i> 20°C	8,32	15,59	0,78	1,30

W przypadku piku azotu (N1s) u *E. coli* w obu temperaturach hodowli pierwiastek ten rozkładał się na kilka składowych, przy czym w hodowli prowadzonej w optymalnej temperaturze tych linii było dwie, natomiast w temperaturze suboptymalnej trzy (Rys. 72). Wyróżnić tu możemy linie o dużej i małej intensywności. Pierwsza z trzech linii u bakterii z hodowli prowadzonej w 20°C, która pojawiła się przy energii wiązania około  $399.0 \pm 0.8$  eV pochodziła od pojedynczego wiązania azotu z węglem (N-C). Nie pojawiła się ona w próbce hodowanej w temperaturze optymalnej 37°C. Druga z linii, o największej intensywności, znajdowała się przy  $400.1 \pm 0.3$  eV i zawierała nieprotonowaną grupę aminową lub amidową. W próbkach hodowanych w temp. optymalnej wiązanie to miało intensywność 86%, zaś w temp. 20°C stanowiło 70%. Ostatnia z nich, przy największej energii wiązania wynoszącej  $401.6 \pm 0.3$  eV pochodziła od sprotonowanej grupy aminowej lub amidowej, a jej intensywność była podobna (w 37°C wynosiła 14%, w 20°C natomiast 11%).



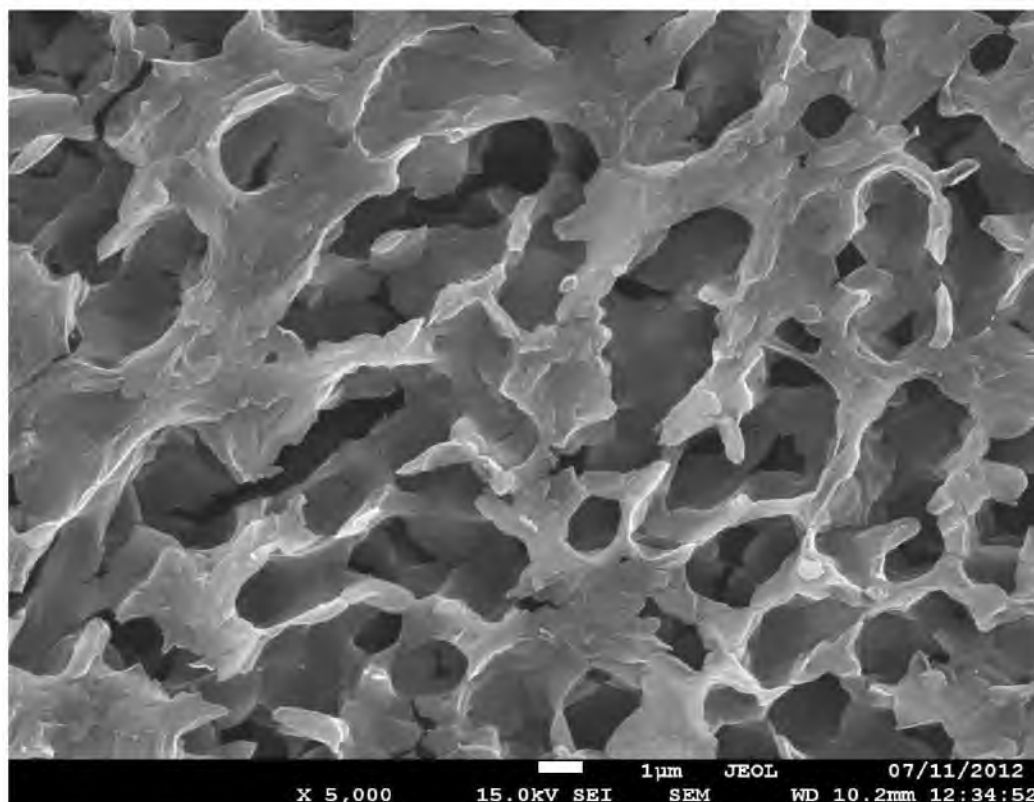
Rys. 72. Zestawienie dopasowania linii N1s u bakterii *Escherichia coli* hodowanych w temp. 37 i 20°C.

Na podstawie danych uzyskanych metodą XPS obliczono stosunki O/C, N/C i P/C powierzchniowych stężeń atomów dla dwóch przebadanych szczepów bakterii (Tab. 20). Analiza wyników wskazała nieznacznie mniejszy wskaźnik koncentracji N/C dla *E. coli*, czyli bakterii Gram-ujemnych, który był równy w obu temp. inkubacji, w odróżnieniu od bakterii Gram-dodatnich z gatunku *B. subtilis*.

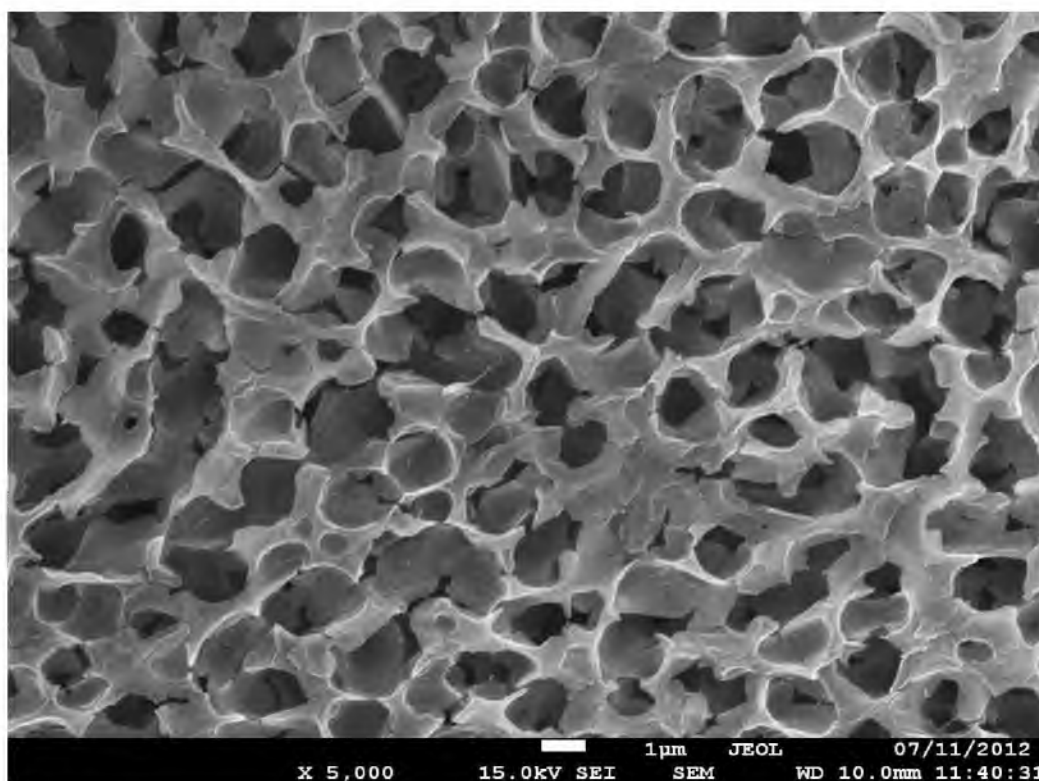
Tabela 20. Stosunek koncentracji atomowej pierwiastków na powierzchni bakterii *B. subtilis* i *E. coli* hodowanych w różnych warunkach temperaturowych (37°C i 20°C).

Rodzaj bakterii	O/C	N/C	P/C
<i>B. subtilis</i> 37°C	0,34	0,19	0,01
<i>B. subtilis</i> 20°C	0,45	0,12	0,03
<i>E. coli</i> 37°C	0,41	0,07	0,01
<i>E. coli</i> 20°C	0,38	0,07	0,01

Użycie skaningowego mikroskopu elektronowego z przystawką mrozącą Cryo pozwoliło na wykonanie mikrofotografii bakterii *E. coli*, dzięki którym uzyskano informacje o ich topografii powierzchni. Na fotografii wykonanej przy powiększeniu 5 000 razy bakterii hodowanych w 37°C (Rys. 73), czyli w temperaturze bardziej korzystnej dla *E. coli*, widoczne są pałeczkowate mikroorganizmy o wielkości około 1µm. Poszczególne bakterie tworzą skupisko drobnoustrojów przylegając do siebie, przy czym są również ściśle osłonięte wspólną otoczką polisacharydową. Między strukturami mikrokolonii widoczne są również sporych rozmiarów kanały, którymi przepływają najprawdopodobniej substancje odżywcze i produkty ich metabolizmu. Na obrazie numer 74, hodowla w 20°C, przy tym samym powiększeniu (5 000 razy), bakterii jest mniej, a dostrzeżenie pojedynczej komórki bakteryjnej jest znacznie trudniejsze. Drobnoustroje są tutaj ułożone luźniej, a cała powierzchnia wygląda jak gąbka, składająca się wyłącznie z biofilmu. Widać tu tym samym, wyraźniej wielowarstwowy charakter kolonii.



Rys. 73. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *E. coli* hodowanych w 37°C (powiększenie 5 000x) (fot. E. Talik).



Rys. 74. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *E. coli* hodowanych w 20°C (powiększenie 5 000x) (fot. E. Talik).

#### 7.4. Wpływ pH podłoża hodowlanego na bakterie z gatunku *B. subtilis*

W przedstawionej pracy badano także wpływ stężenia jonów wodorowych na strukturę powierzchni bakterii. Doświadczenia te prowadzono hodując bakterie *B. subtilis* na podłożach o pH równym 5 oraz pH 9. Bakterie na przygotowanych pożywkach hodowano w temperaturze 37°C przez okres 24 godzin.

Zastosowane techniki, tj. spektrometria fotoelektronów i skaningowa mikroskopia elektronowa, pozwoliły na kompleksowe zbadanie oddziaływania różnego pH środowiska na wzrost drobnoustrojów z gatunku *B. subtilis*. Wyniki otrzymane z analizy powierzchni bakterii za pomocą XPS i SEM umożliwiły poznanie zmian w składzie chemicznym oraz topografii powierzchni tych bakterii, jakie zaszły w ich zewnętrznej warstwie ściany komórkowej pod wpływem innego czynnika środowiskowego hodowli.

W pierwszym etapie eksperymentu określono skład pierwiastkowy powierzchniowej warstwy mikroorganizmów, w oparciu o otrzymane widma przeglądowe XPS oraz zidentyfikowano procentowy skład atomowy powierzchni próbek, na podstawie natężenia poszczególnych pików. Analizując następnie otrzymane widma przeglądowe XPS, które zamieszczono w końcowej części pracy, zwrócono uwagę na dość małą ilość pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowej warstwy bakterii z gatunku *B. subtilis*. Różnice między porównywanymi średnimi wartościami składu pierwiastkowego linii widmowych, odpowiadających poszczególnym pierwiastkom uzyskane z powierzchni bakterii, z hodowli na podłożach o zróżnicowanym pH, przedstawiono w tabeli nr 21. Wyraźnie zaznaczała się w nich dominacja węgla, która jest bardzo wysoka (u *B. subtilis* w hodowli w pH5 = 71,11%, w pH9 = 68,75%) oraz tlenu i azotu. Zaliczono je do pierwiastków głównych (zawartość powyżej > 5 % at.). Wśród pierwiastków pobocznych dominował sód, fosfor i chlor oraz akcesorycznie swoją obecność zaznaczył krzem, przy pH równym 5. Podane w tabeli stężenia atomowe, wyrażone w procentach, są wartościami uśrednionymi.

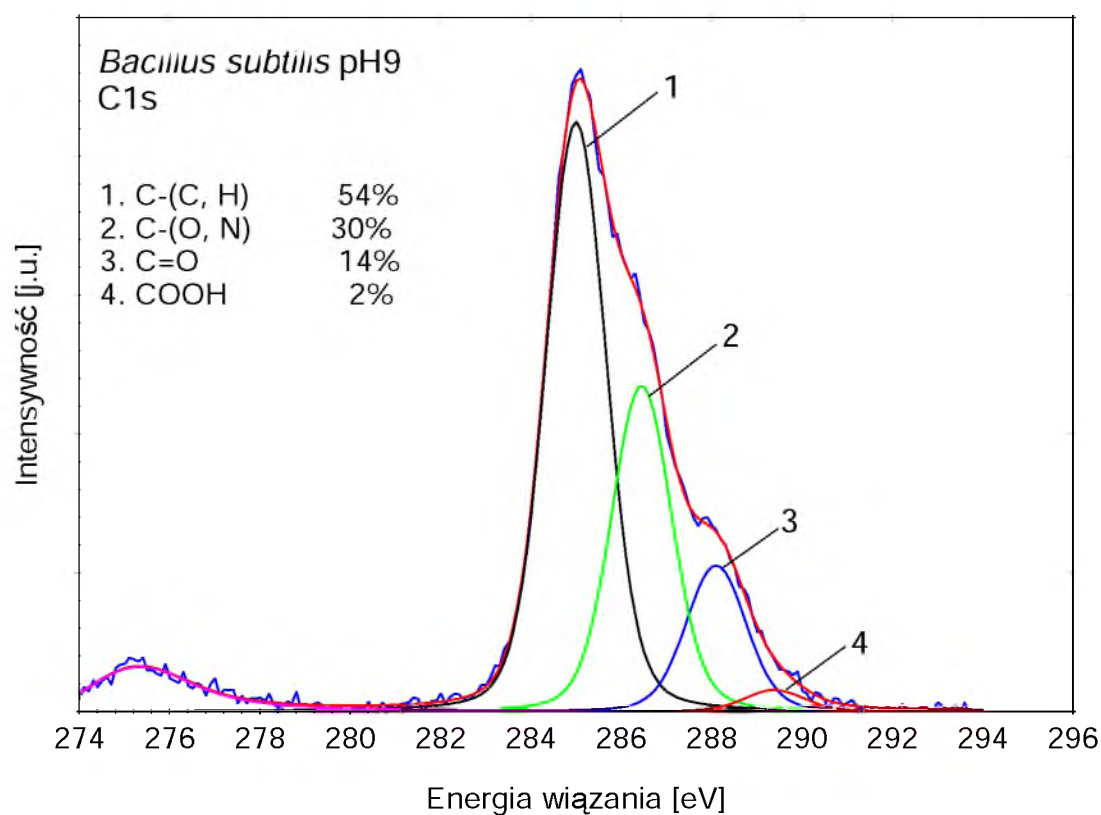
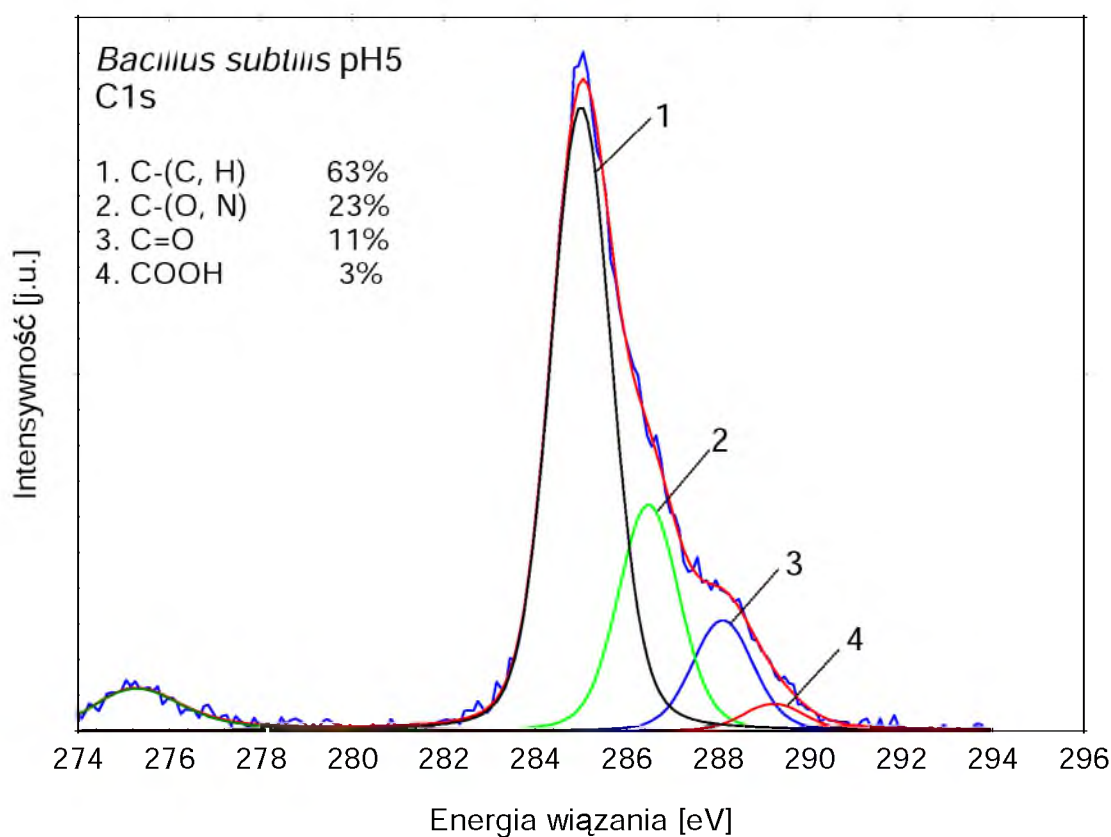
Tabela 21. Koncentracja atomowa pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowych struktur bakterii *B. subtilis* hodowanych w kwaśnym i zasadowym środowisku.

Udział procentowy pierwiastków [% at.]							
Gatunek bakterii	C1s	O1s	N1s	Na1s	P2p	Cl2p	Si2p
<i>B. subtilis</i> pH5	71,11	20,94	5,90	0,86	0,99	0,16	0,04
<i>B. subtilis</i> pH9	68,75	23,40	5,33	1,18	1,21	0,12	0,00

Dodatkowych informacji dostarczyło dopasowanie linii syntetycznych do otrzymanych widm fotoelektronów (Rys. 75-77). Rozszczepienie pasma podstawowego, bowiem na kilka składowych świadczyło o obecności różnych związków chemicznych atomów danego pierwiastka. Wykonano je dla pierwiastków o największej intensywności, czyli węgla (C1s), tlenu (O1s) oraz azotu (N1s). W celu ich porównania, zestawiono je parami dla obu gatunków bakterii hodowanych na podłożach o różnym pH. We wszystkich przypadkach, zauważono, iż linie tych pierwiastków zawsze składały się z kilku składowych (od 3 do 4). Poszczególne z nich różniły się nieznacznie intensywnościami i energią wiązania. Świadczy to o tym, że zarówno węgiel, tlen, jak i azot wchodzi w skład różnych rodzajów wiązań chemicznych, które budują powierzchniową warstwę badanych bakterii. Szczegółowych informacji o sugerowanym wiązaniu, jego położeniu i intensywności (I w %) dostarcza tabela nr 22.

Tabela 22. Wyniki występowania C1s, O1s i N1s w różnych połączeniach chemicznych oraz ich intensywności dla badanych bakterii *B.subtilis* hodowanych w różnym środowisku pH.

Próbka	<i>B.subtilis</i> pH5			<i>B.subtilis</i> pH9		
	Sugerowane wiązanie	Energia wiązania [eV]	I %	Sugerowane wiązanie	Energia wiązania [eV]	I %
<b>C1s</b>	C-(C, H)	285.0	63	C-(C, H)	285.0	54
	C-(O, N)	286.5	23	C-(O, N)	286.4	30
	C=O	288.1	11	C=O	288.1	14
	COOH	289.2	3	COOH	289.4	2
<b>O1s</b>	O=C	531.6	42	O=C	531.4	35
	O-(C,N)	533.0	55	O-(C,N)	532.9	61
	COOH	-	-	COOH	-	-
	H <sub>2</sub> O	535.8	3	H <sub>2</sub> O	535.9	4
<b>N1s</b>	Dodatkowa linia	397.5	4	Dodatkowa linia	397.6	2
	N-C	-	-	N-C	-	-
	N <sub>nieprotonowany</sub>	400.0	91	N <sub>nieprotonowany</sub>	399.9	90
	N <sub>protonowany</sub>	401.8	5	N <sub>protonowany</sub>	401.5	8

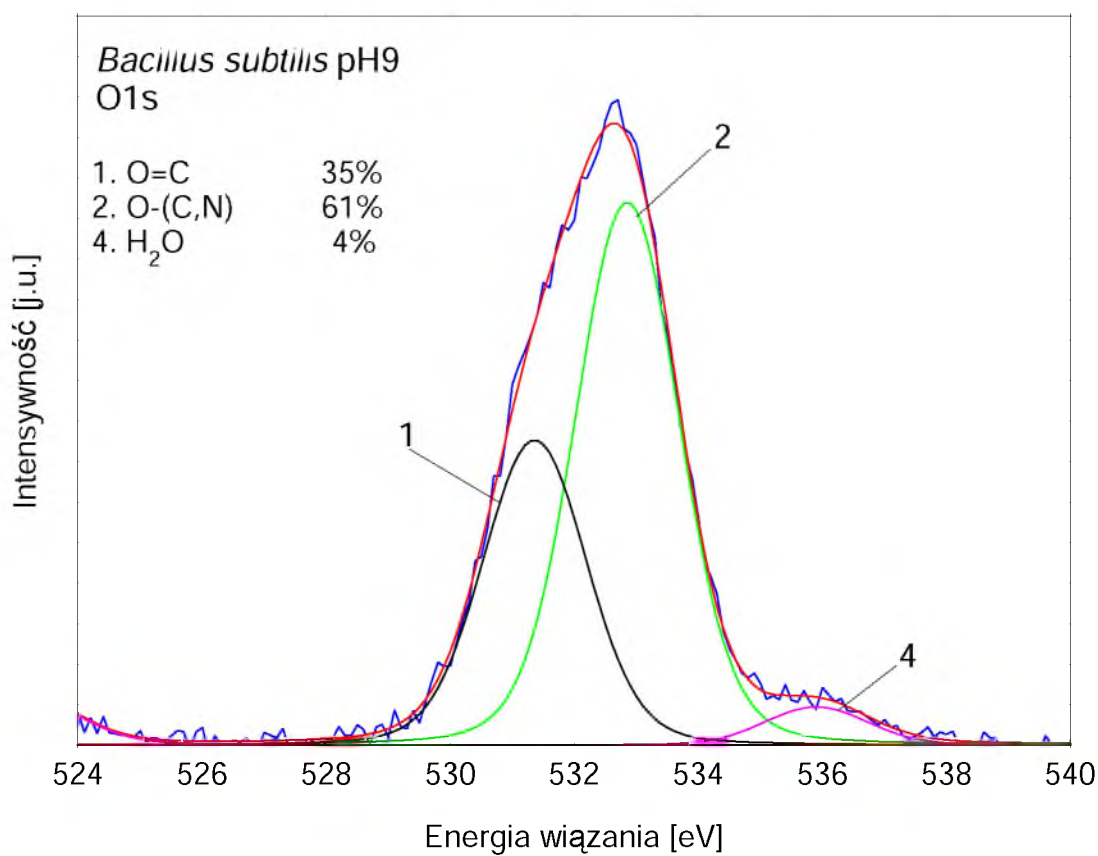
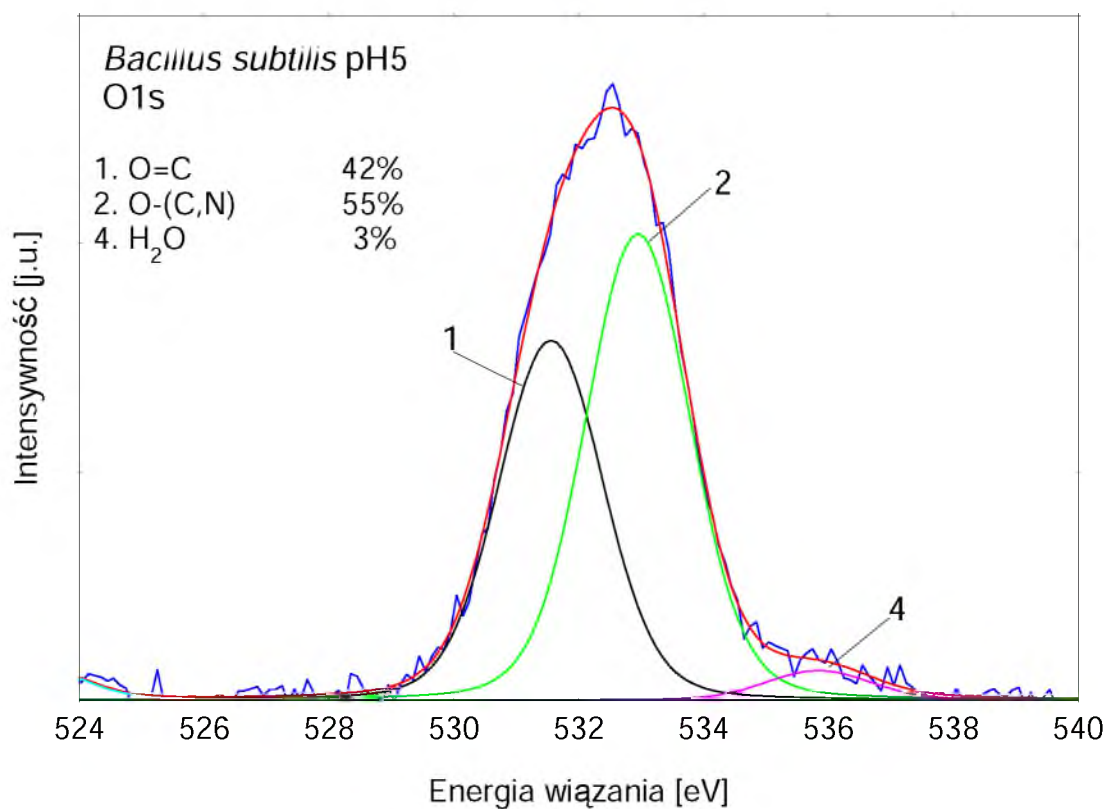


Rys. 75. Widma XPS linii C1s dla *B. subtilis* hodowanych w kwasowym i zasadowym odczynie środowiska.

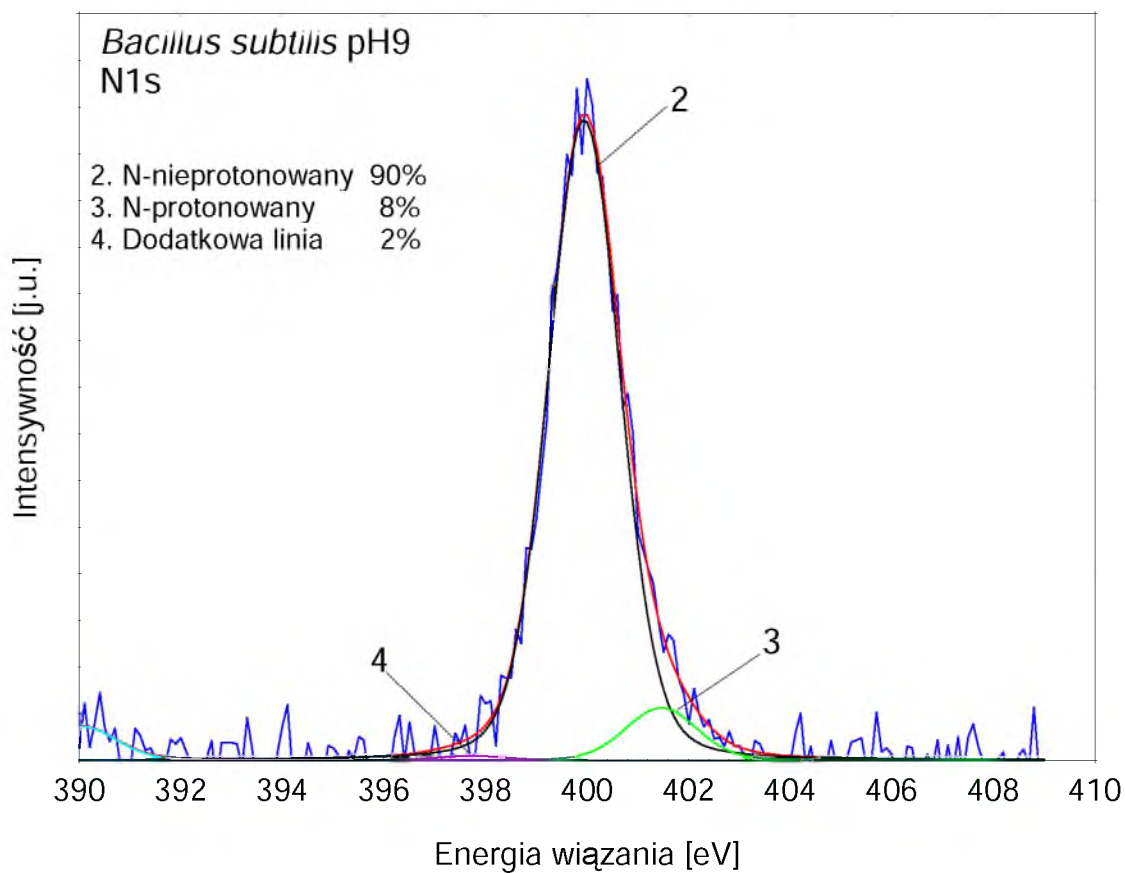
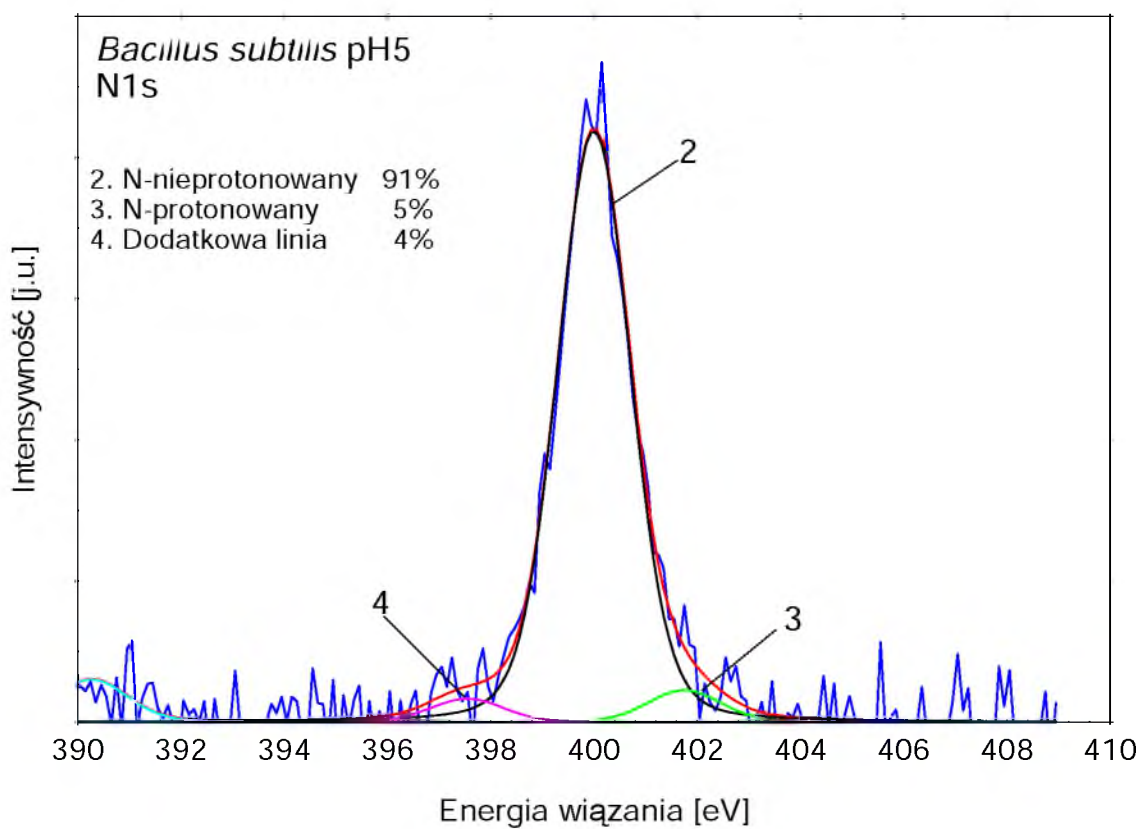
Na rysunku nr 75 przedstawiono zestawienie linii regionu węgla (C1s) po dopasowaniu, gdzie główna linia wykorzystywana do kalibracji energii wiązania dla wszystkich analizowanych próbek leży przy  $E_W = 285.0$  eV. W jego skład wchodziły 4 singletowe linie spektralne, oddalone od siebie zwykle o 1.5 eV. Nie zauważono pomiędzy nimi znacznych różnic, jeśli chodzi o kształt oraz intensywność poszczególnych grup funkcyjnych. Przy energii wiązania 285.0 eV widoczna była linia pochodząca od stanów elektronowych C1s, co związane było z obecnością na powierzchni próbki pojedynczych wiązań C-C i C-H w łańcuchach alifatycznych. Wiązania te dominują swą intensywnością i znacznie przewyższają pozostałe wykryte grupy funkcyjne w obu próbkach (63% przy pH5 i 54% pH9). Kolejna linia pochodziła od wiązań C-O i C-N przy  $286.5 \pm 0.3$  eV, następna od C=O przy 288.1 eV, natomiast ostatnia od węgla znajdującego się w grupie karboksylowej, znajdującej się w okolicy  $289.2 \pm 0.3$  eV.

Kolejne rysunki (nr 76 i 77) przedstawiają zestawienie linii z dopasowania poziomów rdzenia dla regionu tlenu (O1s) oraz azotu (N1s), uzyskane z powierzchni badanych mikroorganizmów. Wszystkie wartości szczytowe, maksima linii jednego szczepu do drugiego są niemal identyczne. Składały się z takiej samej ilości składników i występowały przy bardzo zbliżonych energiach wiązania ( $\pm 0.3$  eV). Jak w poprzednich przypadkach, tlen i azot obecny na powierzchni badanych bakterii wchodził w skład kilku związków chemicznych, o czym świadczy podział na trzy singletowe linie. Pierwsza z linii regionu tlenu, wykrytych u bakterii hodowanych w środowisku o różnym pH, pochodziła od atomu tlenu połączonego wiązaniem podwójnym z atomem węgla (O=C). Występowała ona przy niższych energiach wiązania, równych około  $531.5 \pm 0.3$  eV. Następna linia została utworzona przez fotoelektrony pochodzące od tlenu związanego pojedynczo z węglem lub azotem O-(C, N), przy  $533.0 \pm 0.3$  eV. Kolejna, trzecia linia, pochodząca od grupy karboksylowej COOH, która zwykle występowała w pikie tlenu, nie pojawiła się w badanych próbkach. Natomiast w obu hodowlach ukazała się, w bardzo małej ilości, linia pochodząca od wody (3-4% intensywności), której obecność związana była z pojawieniem się składowej w kierunku wyższych energii wiązania, powyżej  $535.8 \pm 0.3$  eV.





Rys. 76. Widma XPS linii O1s dla *B. subtilis* hodowanych w kwasowym i zasadowym odczynie środowiska.



Rys. 77. Widma XPS linii N1s dla *B. subtilis* hodowanych w kwasowym i zasadowym odczynie środowiska.

Linie spektralne azotu, obu próbek bakterii hodowanych w różnym środowisku pH, rozkładały się również na trzy składowe, przy czym, pierwsza z linii, która pojawiała się zwykle w niewielkiej intensywności w widmie N1s, pochodząca od azotu pojedynczo związanego z węglem (N-C), w próbkach w tym środowisku nie wystąpiła. Linia o największej intensywności, która wystąpiła przy energii wiązania równej  $400.0 \pm 0.3$  eV pochodziła od nieprotonowanej grupy aminowej, a jej intensywność była bardzo wysoka, bo równa w obu próbkach 90 i 91%. Następną składową była linia występująca przy  $401.8 \pm 0.3$  eV, pochodząca od protonowanej grupy aminowej (przy pH5 jej intensywność wynosiła 5%, a w pH9 2%). Bardzo ciekawe było natomiast pojawienie się przy dość niskiej energii wiązania, równej  $397.5 \pm 0.1$  eV, dla badanego szczepu *Bacillus* dodatkowej, niezidentyfikowanej linii. Intensywność tego dodatkowego wiązania wyniosła w środowisku kwasowym 4%, zaś w środowisku zasadowym 2%.

Dane ilościowe otrzymane metodą XPS pozwoliły również na obliczenie stosunków koncentracji atomowej O/C, N/C i P/C powierzchniowych stężeń atomów dla przebadanych szczepów bakterii. Dzięki temu możliwa była ocena stopnia wrażliwości struktur powierzchniowych bakterii na stężenie jonów wodorowych (Tab. 23). Inkubacja w środowisku kwasowym spowodowała spadek wskaźnika O/C, czyli całkowitego tlenu do węgla z 0,34 do 0,29, natomiast w obu zakresach wartości pH środowiska wskaźnik koncentracji N/C wynosił 0,08.

Tabela 23. Stosunek koncentracji atomowej pierwiastków na powierzchni bakterii *B. subtilis* hodowanych na podłożach o zróżnicowanym odczynie (pH 5 i 9).

Rodzaj bakterii	O/C	N/C	P/C
<i>B. subtilis</i> pH5	0,29	0,08	0,01
<i>B. subtilis</i> pH9	0,34	0,08	0,02

Obliczono również zawartości poszczególnych typów wiązań w stosunku do całkowitej koncentracji wykrytego w badanym materiale węgla oraz tlenu w próbkach (Tab. 24 i 25). Miało to za zadanie zobrazowanie zmienności występowania poszczególnych grup funkcyjnych danego pierwiastka w zależności od odczynu podłoża hodowlanego.

Tabela 24. Udział poszczególnych typów wiązań w związkach do całkowitej procentowej zawartości wykrytego węgla na podłożach o zróżnicowanym pH (5 i 9).

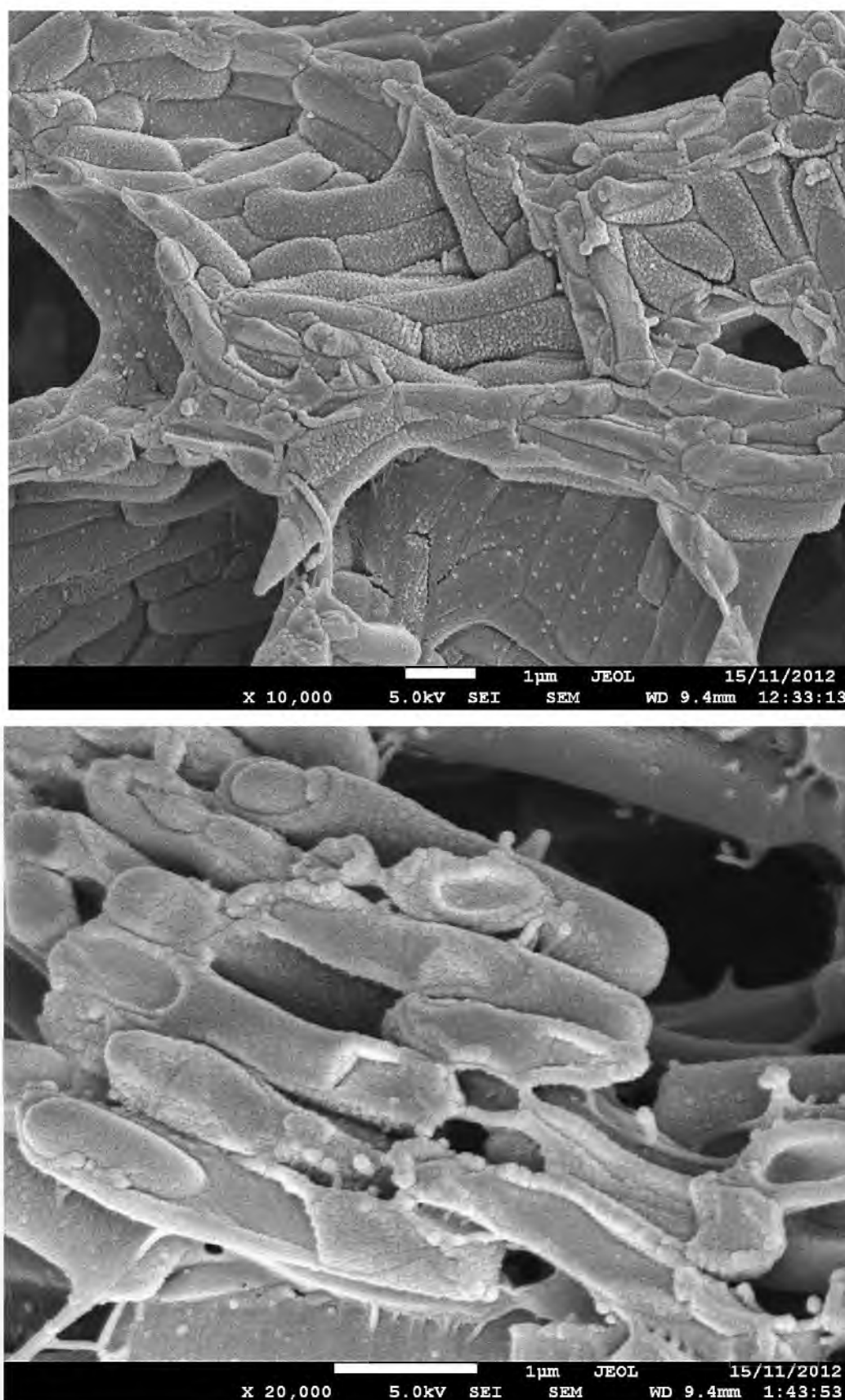
Sugerowane wiązanie	(1) C-(C, H)/C	(2) C-(O, N)/C	(3) C=O/C	(4) COOH/C	(5) Dodatkowa linia/C
<i>B. subtilis</i> pH5	44,80	16,36	7,82	2,13	-
<i>B. subtilis</i> pH9	37,13	20,63	9,63	1,36	-

Wyniki zawarte w powyższej tabeli (Tab. 24) wskazują, że wraz ze wzrostem zawartości wiązania węglowodorowego na powierzchni próbki maleje zawartość grupy C-(O, N) i odwrotnie. W przypadku tlenu natomiast ta zależność, w mniejszym stopniu dotyczy wiązania O=C i O-(C, N) (Tab. 25).

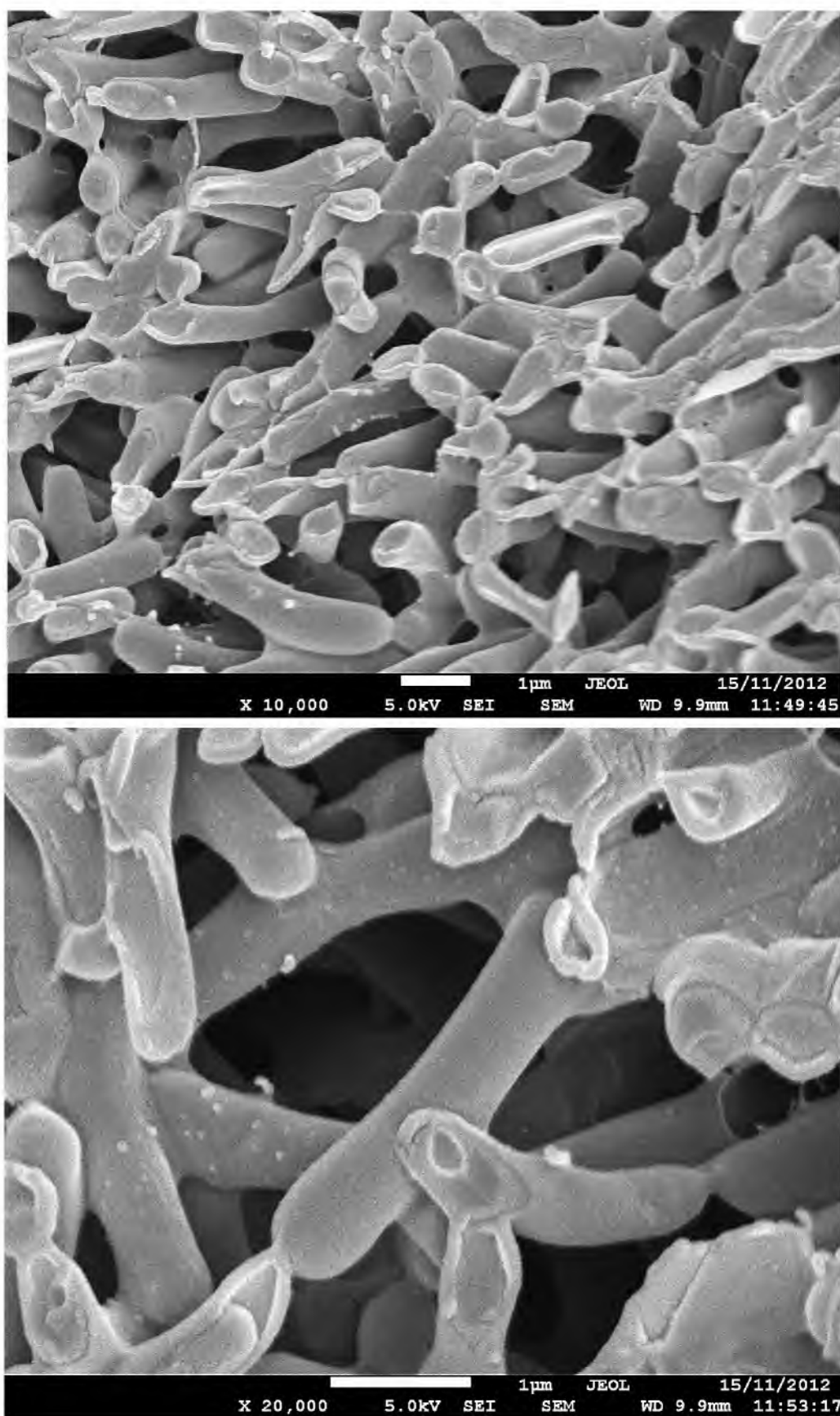
Tabela 25. Zawartość poszczególnych typów wiązań w związkach do całkowitej procentowej zawartości wykrytego tlenu na podłożach o zróżnicowanym pH (5 i 9).

Sugerowane wiązanie	(1) O=C/O	(2) O-(C, N)/O	(3) COOH/O	(4) H <sub>2</sub> O/O	(5) Dodatkowa linia/O
<i>B. subtilis</i> pH5	8,79	11,52	-	0,63	-
<i>B. subtilis</i> pH9	8,19	14,27	-	0,94	-

Badany materiał poddano dalszym analizom, w celu określenia zmian powstałych na ich powierzchni pod wpływem różnego pH podłoża hodowlanego. Ocenę struktury powierzchni bakterii *B. subtilis* wykonano z wykorzystaniem elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) i przystawki mrożącej Cryo. W celu dokładnej analizy powierzchniowej zastosowano zróżnicowane powiększenia (10 i 20 tys. razy). Większe powiększenie pozwoliło na dokładniejszą analizę morfologiczną, natomiast mniejsze lepiej uwidaczniało strukturę przestrzenną badanego materiału. Na obu mikrofotografiach, przy powiększeniach 10 000x, widać liczne zgrupowania drobnoustrojów. W przypadku szczepów *B. subtilis* obrazy analizowanej powierzchni różniły się nieznacznie. Mikroorganizmy wyrosłe na podłożu o pH=9 prezentują się jak zorganizowane przestrzennie struktury, które układają się w uporządkowane, skomplikowane i połączone ze sobą mikrokolonie (Rys. 78). Wytworzyły one wokół siebie najprawdopodobniej wspólną warstwę śluzu. Bakterie hodowane na podłożu o pH równym 5 widoczne są natomiast w postaci rozproszonych, pojedynczych komórek, ułożonych w kilku warstwach (Rys. 79).



Rys. 78. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *B. subtilis* rosnących na podłożu o pH równym 9 (powiększenia 10 i 20 tys. razy; fot. E. Talik).



Rys. 79. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii *B. subtilis* rosnących na podłożu o pH równym 5 (powiększenia 10 i 20 tys. razy; fot. E. Talik).

Przy powiększeniu 20 000x zauważono inną teksturę powierzchni w zależności od pH środowiska hodowlanego. U bakterii hodowanych w pH równym 5 powierzchnia ich była gładka z nielicznymi wypustkami, natomiast wyższy odczyn inkubacji bakterii *B. subtilis* spowodował zmiany w mikrostrukturze ich powierzchni. W hodowli prowadzonej na podłożu o odczynie zasadowym stała się ona bardziej szorstka i chropowata.

## 8. Dyskusja

Celem przeprowadzonych badań była ocena składu chemicznego, struktury elektronowej oraz morfologii bakterii za pomocą technik stosowanych w fizyce materii skondensowanej. Rozprawa ma charakter interdyscyplinarny, a jej innowacyjność polegała na połączeniu danych otrzymanych przy użyciu fizycznych technik analitycznych, służących do charakteryzowania właściwości powierzchni z wiedzą dotyczącą budowy zewnętrznych struktur komórkowych bakterii. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż problematyka łącząca te dziedziny nie była dotychczas przedmiotem odrębnego, szerszego opracowania naukowego. Do realizacji przedstawionych celów badawczych wykorzystano wielofunkcyjny spektrometr fotoelektronów wzbudzony promieniami rentgenowskimi XPS PHI 5700/660 oraz skaningowy mikroskop elektronowy SEM firmy JEOL z dodatkową przystawką mrozącą Cryo. W momencie rozpoczęcia badań nieliczne publikacje dotyczyły morfologii komórek bakterii z użyciem przystawki do szybkiego mrożenia Cryo-SEM [87, 88].

Istnieje zaledwie kilka technik umożliwiających uzyskanie ilościowych danych o składzie pierwiastkowym i grupach funkcyjnych uwodnionych próbek biologicznych, które nie naruszają ich delikatnej zewnętrznej powierzchni. Jedną z takich technik jest właśnie zastosowany spektrometr fotoelektronów wzbudzony promieniami rentgenowskimi (XPS). Wynikiem badań przeprowadzonych przy użyciu tej aparatury było uzyskanie informacji nie tylko o składzie procentowym pierwiastków obecnych w badanym materiale, ale również określenie grup funkcyjnych budujących ścianę komórkową danych bakterii [89]. Technika ta najczęściej wykorzystywana była do badania niebiologicznych powierzchni (metale, minerały), jednak coraz częściej stosowana jest również do analizy komórek prokariotycznych i eukariotycznych [90, 91]. Badanie powierzchni i delikatnych komórek bakterii jest jednak znacznie trudniejsze przede wszystkim ze względu na ich uwodniony charakter. W większości przypadków przygotowanie materiału biologicznego do analizy w XPS polegało na jego wcześniejszej liofilizacji, gdyż badania z użyciem XPS odbywają się w warunkach wysokiej próżni [91-93]. Taki sposób przygotowywania próbek biologicznych budził jednak wątpliwości z uwagi na ewentualny wpływ tego procesu na badane powierzchnie w stosunku do powierzchni w ich naturalnym stanie uwodnionym [93-95]. Jak wykazały ostatnie badania za pomocą spektrometru, możliwe jest badanie bakterii pobranych bezpośrednio z kolonii rosnącej na powierzchni agaru, z pominięciem dodatkowej metody ich utrwalania [96, 97]. Otrzymane wyniki pokazały, iż woda zawarta w badanych mikroorganizmach bakteryjnych jest tak silnie z nimi związana, że mimo panującej



w spektrometrze wysokiej próżni ( $10^{-8}$  Pa), nie następuje jej parowanie. Próżnia w komorze pomiarowej pozwala, zatem na zachowanie ich naturalnego stanu. W ten sposób znacznie uproszczono sposób przygotowania próbek do badania powierzchni komórek bakteryjnych za pomocą techniki XPS. Należy jednak pamiętać, iż na skład chemiczny materiału biologicznego ma wpływ wiele czynników, w tym warunki hodowli, specyfika składników odżywczych i stan fizjologiczny badanych organizmów. Wszystko to jest dodatkowym źródłem zmienności składu powierzchniowego delikatnych próbek biologicznych, co może mieć z kolei istotny wpływ na końcowe wyniki pomiarów.

Wszystkie otrzymane widma XPS pasm podstawowych dla przebadanych bakterii w zakresie energii wiązania od -3 do 33 eV miały charakter polimerowy, jak pokazano na rysunkach nr 43. Wyniki badań natomiast wykonane w szerokim zakresie energii, uzyskane dla badanych mikroorganizmów oraz otrzymane dane dotyczące składu atomowego powierzchni próbek dostarczyły informacji na temat typów wiązań tworzonych przez dany pierwiastek [98, 99].

W pracy badano m.in. bakterie pobrane w pomieszczeniach użyteczności publicznej, jak gabinety stomatologiczne. Ilościowo dominującymi bakteriami były tam mikroorganizmy z rodzaju *Staphylococcus*. Duża ich ilość w badanym środowisku, związana była przede wszystkim z obecnością ludzi, którzy stanowią ich znaczące źródło emisji [100]. Szczegółowe badania wykonano dla szczepów bakterii Gram-dodatnich z tego rodzaju, czyli *S. sciuri*, *S. equorum* i *Staphylococcus* sp. Analizując otrzymane widma XPS dla tych bakterii otrzymano linie o różnej intensywności. Składały się one z dwunastu różnych pierwiastków, których zawartość normalizowana była do 100% i wyrażona w procentach atomowych. Największą intensywnością wyróżniały się linie spektralne węgla (C1s), które stanowiły około 66~72% udziału wszystkich wykrytych pierwiastków, następnie linie tlenu (O1s) wynoszące od 19~21% oraz azotu (N1s) od 5~11%. Razem te trzy pierwiastki stanowiły prawie ~98% całości wykrytego składu pierwiastkowego próbek, czyli są podstawowym budulcem badanych komórek bakterii i to one decydują o ich składzie chemicznym. Zaliczono je tym samym do pierwiastków głównych, które tworzą grupę makroelementów strukturalnych budujących te mikroorganizmy. Oprócz linii głównych pierwiastków, zidentyfikowano również w widmie przeglądowym pierwiastki akcesoryczne, tzw. mikroelementy, których udziały nie przekraczały 1% atomowego, były to m.in. takie pierwiastki jak, np.: Na1s, P2p, Cl2p czy S2p. Bardzo ważnym pierwiastkiem jest tutaj fosfor (P2p), który w ścianie komórkowej bakterii Gram-dodatnich występuje w postaci fosforanów. Stanowią one łącznik pomiędzy kwasami tejchojowymi i peptydoglikanem, a ich wysoka

zawartość nadaje kwasom tejchojowym silnie kwasowy charakter, obdarzając bakterie ładunkiem ujemnym, odpowiedzialnym w dużej mierze za ogólny ładunek ujemny na powierzchni komórki bakterii Gram-dodatnich [13].

Dalsze badania dotyczyły bakterii pobranych w obiektach komunalnych, takich jak oczyszczalnie ścieków, które poza swą zasadniczą pozytywną rolę, służącą ochronie środowiska, mogą też oddziaływać niekorzystnie na otoczenie, w tym na powietrze atmosferyczne, którym oddychamy. Głównymi czynnikami biologicznymi zanieczyszczającymi powietrze, są bowiem w dużej mierze mikroorganizmy występujące w powietrzu, tzw. bioaerozol [101]. Do jednych z najczęściej wykrywanych mikroorganizmów w powietrzu oczyszczalni są także bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. Do pracy przebadano trzy z nich, były to szczepy: *S. gallinarum*, *S. xylosus* oraz *S. lentus* [100]. Bardzo powszechne w tym środowisku są również laseczki z rodzaju *Bacillus*, a szczegółowe badania wykonano dla bakterii *B. mycoides* oraz *B. cereus*. W obu rodzajach bakterii, pobranych z oczyszczalni ścieków, wykryto po dziewięć różnych pierwiastków, przy czym węgiel zawsze przekraczał udział wszystkich pozostałych pierwiastków, a jego koncentracja atomowa wynosiła ponad ~64%, następnym pierwiastkiem był tlen (<20%) oraz azot (<7%). Otrzymane wyniki analiz składu chemicznego dotyczące procentowego udziału głównych pierwiastków na powierzchni różnego rodzaju bakterii pokrywają się z wcześniej opublikowanymi pracami [102, 103].

Badania struktury elektronowej bakterii metodą XPS umożliwiają sprawdzenie, w jakich grupach funkcyjnych może występować dany pierwiastek w ich ścianie komórkowej. Dlatego też, w dalszej kolejności zmierzono stany elektronowe w węższym zakresie pomiarowym energii wiązania dla pierwiastków głównych. Stwierdzono tym samym, iż główne linie C1s, O1s i N1s były złożone z kilku składowych u każdej próbki biologicznej. Położenie maksimum analizowanego sygnału i zmiana kształtu linii sugerowały zmianę stanu chemicznego danego pierwiastka, co miało istotne znaczenie przy określaniu grup funkcyjnych w poszczególnych związkach organicznych budujących powierzchnię bakterii. Znając te dane można było, odnosząc się do odpowiednich baz danych i katalogów, dokonać wstępnej analizy chemicznej [60]. Analiza ta wykazała, iż linia węgla C1s we wszystkich przebadanych gatunkach z rodzaju *Staphylococcus*, rozkładały się na 3 do 5 singletowych linii spektralnych, oddalonych od siebie kolejno o około 1.5 eV. Najbardziej intensywna linia we wszystkich przypadkach, o energii wiązania równej 285.0 eV, wykorzystywana do kalibracji skali, pochodziła od pojedynczego wiązania węgla z węglem lub węgla z wodorem C-(C, H), tworzącego grupę węglowodorową. Grupy te występują licznie w aminokwasach i

lipidach, co następnie odpowiada białku lub peptydoglikanowi w ścianie komórkowej bakterii. Drugą linią pochodzącą od pojedynczych wiązań węgla z tlenem i węgla z azotem (C-O i C-N), zawierających ester, alkohol, aminy i amidy była linia występująca przy energii wiązania  $286.5 \pm 0.5$  eV. Trzecią wykrytą linią, pochodzącą od podwójnego wiązania węgla z tlenem C=O, czyli grupy karbonylowej lub wiązania peptydowego HN-C=O była linia znajdująca się przy  $288.0 \pm 0.5$  eV. Niewykluczone, że może ona również pochodzić od dwóch pojedynczych wiązań węgla z tlenem C-O-C. Wiązania te obecne są w amidach karbonylowych, karboksylanach, estrach i acetalach lub hemiacetalach, występujących licznie w wiązaniu glikozydowym. Otrzymane wyniki są zbieżne z wcześniej opublikowanymi pracami dla linii C1s [92, 104, 105]. Czwartą linią, która pojawiła się we wszystkich próbkach z oczyszczalni ścieków było wiązanie COOH. Jest to grupa karboksylowa, której linia znajdowała się przy  $289.0 \pm 0.5$  eV. Grupy te występują w aminokwasach ściany komórkowej, odpowiednio podstawione mono- i polisacharydami [92, 106, 107]. Nie ujawniła się natomiast ta grupa w próbkach z gabinetu dentystycznego. Interesująca obserwacja dotyczyła natomiast pozycji pików odpowiadającego energii wiązania  $283.6 \pm 0.4$  eV. Ta dodatkowa linia, pojawiła się w próbkach bakterii *S. gallinarum* i *S. xylosus* pobranych na terenie oczyszczalni wód. Z przeprowadzonych badań można wyciągnąć wnioski, iż linie te, występujące w tak niskiej energii wiązania związane są z defektami powierzchni.

W przypadku grup funkcyjnych związanych z tlenem rejestrowane przesunięcia energii wiązania odpowiadają również kilku składowym. Pierwsza z nich o mniejszej energii wiązania, we wszystkich próbkach, występująca przy podobnej wartości energii wiązania tj.  $531.4 \pm 0.3$  eV, została utworzona przez fotoelektrony pochodzące od tlenu z wiązania O=C. To wiązanie zawierają kwasy karboksylowe, ale i karboksylan, estry lub amidy. Dają one największy wkład w skład ściany komórkowej bakterii, ponieważ stanowią one bardzo ważny składnik ich ściany, czyli peptydoglikanu. Druga linia natomiast pochodzi od wiązania O-C lub też od O-CH, czyli wodorotlenku. Może ona również pochodzić od wiązania eterowego C-O-C, posiadającego hemiacetal i grupę eterową, przy energii wiązania około 532.7 eV. Otrzymane wyniki pokrywają się z energiami wiązania otrzymanymi przez innych autorów dla linii O1s [92, 99, 108]. Trzecia linia O1s, która wystąpiła u badanych bakterii pochodziła najprawdopodobniej od wiązania karbonylowego O-C=O. Jej pik pojawiał się przy około  $533.3 \pm 0.4$  eV. Przy energii wiązania równej  $534.6 \pm 0.2$  eV natomiast pojawiło się w śladowej ilości wiązanie COOH, jak u *S. sciuri*. W kilku próbkach wystąpiła linia o bardzo

małym natężeniu przy  $535.5 \pm 0.3$  eV, powstała najprawdopodobniej z wbudowanej w strukturę ściany komórkowej wody.

Linia azotu N1s dla bakterii z rodzaju *Staphylococcus* rozkładała się zawsze na trzy składowe, przy czym wyróżnić tu możemy dwie składowe o słabym natężeniu i jedną o dużym, której intensywność wynosiła zwykle ponad ~85%. Linia ta, występowała przy energii wiązania  $399.9 \pm 0.3$  eV i pochodziła od nieprotonowanej grupy aminowej lub amidowej, zaangażowanej w aminy lub amidy [103, 104]. Jedna ze składowych o niskim natężeniu, występująca przy energii wiązania  $398.5 \pm 0.6$  eV pochodziła natomiast od pojedynczego wiązania azotu z węglem, czyli grupy białek aminowych i amidowych. Druga z nich przy  $E_w = 401.5 \pm 0.3$  eV swój udział bierze od protonowanego azotu, czyli protonowanej grupy aminowej lub amidowej [91, 105]. Analizując wszystkie linie, jedynie w próbce z gatunku *S. gallinarum* dość znacznie zwiększyła się zawartość protonowanej grupy aminowej (24%), zaś spadła intensywność azotu nieprotonowanego, który zwykle dominował (do 61%). U *S. xylosus* wynosił 85%, natomiast u *S. lentu* 78%.

Dopasowanie liniami syntetycznymi linii węgla, tlenu i azotu dla dwóch bakterii *B. cereus* i *B. mycoides*, pobranych z oczyszczalni ścieków, pozwoliło również na ilościowe określenie grup funkcyjnych wchodzących w skład związków chemicznych budujących ściany komórkowe tych mikroorganizmów. Wykazywały one duże podobieństwo, co wynika z faktu, iż obie bakterie są ze sobą dosyć blisko spokrewnione. Cechuje je znaczna zgodność fenotypowa i genotypowa, bowiem podobieństwo sekwencji 16S rRNA gatunków *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* i *B. mycoides* przekracza 99% [109]. Otrzymane wyniki były zgodne z energiami wiązania wyznaczonymi dla *B. subtilis* oraz wartościami literaturowymi opublikowanymi przez Leone i in., (2006) [110] oraz Rouxhet i Genet, (2011) [111]. U wymienionych autorów oprócz podstawowych wiązań w linii węgla, tlenu i azotu również pojawiły się dodatkowe linie przy energii wiązania równej  $284 \pm 0.1$  eV. W przedstawionych w pracy badaniach ich intensywności wynosiły 6% u *B. mycoides* i do 10% u *B. cereus*.

Wszystkie, znajdujące się w przebadanych próbkach główne pierwiastki (C1s, O1s i N1s), występowały w kilku podobnych połączeniach chemicznych, ponieważ wykazywały złożony charakter linii spektralnych. Jedyne różnice, jakie między nimi się pojawiły to ich intensywności, określające udział poszczególnych grup funkcyjnych w warstwie powierzchniowej bakterii. Ponadto, obliczono proporcje koncentracji atomowych pierwiastków O, N i P w stosunku do całkowitego węgla (O/C, N/C i P/C), dla bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, zarówno pochodzących z gabinetów stomatologicznych, jak i oczyszczalni ścieków oraz bakterii z rodzaju *Bacillus* pobranych z terenów oczyszczalni.

Wszystkie szczepy *Staphylococcus* miały wysokie wskaźniki koncentracji O/C, przy czym wahały się one nieznacznie, odpowiednio od 0,303 u *S. xylosus* do 0,372 u *S. gallinarum*, jednakże u bakterii *Staphylococcus* sp. stosunek ten był dosyć niski i wyniósł 0,273. Tak wysoki stosunek koncentracji tlenu do węgla w przypadku bakterii z rodzaju *Staphylococcus* związany jest z obecnością w ich ścianie komórkowej dużej ilości polisacharydów, z których zbudowana jest mureina. Stosunek ten jest natomiast bardzo różny u bakterii *Bacillus*: w przypadku *B. mycoides* wynosi on 0,275, zaś u *B. cereus* 0,341. Zawartość peptydów oraz białek powierzchniowych w ścianie komórkowej bakterii odzwierciedla natomiast wartość wskaźnika koncentracji N/C, który w przypadku bakterii z rodzaju *Staphylococcus* wynosił od 0,075 u *Staphylococcus* sp. do 0,189 u *S. lentus*. U bakterii z rodzaju *Bacillus* ten wskaźnik był niższy, bo  $0,104 \pm 0,004$ . Białka znajdujące się głównie na zewnętrznej powierzchni ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich mogą pełnić funkcję adhezyn, pozwalając na przyleganie komórki do podłoża lub tkanek gospodarza. Bakterie, jakimi są gronkowce (*Staphylococcus*) charakteryzują się bardzo dużymi właściwościami adhezyjnymi, ze względu na zasiedlanie przez nie powierzchni ciała ludzi, zwierząt oraz błon śluzowych. Największa różnica pomiędzy tymi dwoma rodzajami bakterii ujawnia się jednak w stosunku fosforu do węgla P/C, który jest o rząd wielkości mniejszy u mikroorganizmów *Bacillus* niż u ziarniaków bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (0,011 *S. xylosus*, 0,017 *S. gallinarum* oraz 0,002 *B. mycoides* i 0,004 *B. cereus*). Związane jest to z bardzo niską zawartością fosforu w ścianie komórkowej bakterii *Bacillus* (0,12-0,28%), ale również z mniejszą ilością w ich ścianie kwasów tejchojowych, gdyż niektóre gatunki bakterii wytwarzają zamiast bogatych w fosfor kwasów tejchojowych, kwasy tejchuronowe, złożone z utlenionych form cukrów [91, 110, 112]. Wstępnie można uznać, iż tlen występował u tych bakterii w grupach fosforanowych, zaangażowanych w (lipo)tejchojowe kwasy lub fosfolipidy.

Poznanie struktury i składu pierwiastkowego powierzchni komórek bakterii oraz modyfikacji, jakie w nich powstają jest istotne ze względu na fakt, iż struktury te, jako pierwsze kontaktują się ze środowiskiem, chronią komórki przed szkodliwymi substancjami i uczestniczą w interakcjach między innymi komórkami bakterii [90, 113, 114]. Drobnoustroje, jak już wiemy, najlepiej i najszybciej rozwijają się i żyją w określonych warunkach środowiskowych. Mimo, iż odznaczają się dużymi zdolnościami przystosowawczymi do warunków otoczenia, to jednak optymalny wzrost hodowli drobnoustrojów uzyskuje się w ściśle określonych dla nich okolicznościach. Duży wpływ na wzrost i rozwój mikroorganizmów odgrywają warunki, które mogą zarówno stymulować

procesy życiowe mikroorganizmów, jak również hamować ich rozwój. Jednym z takich czynników, który bardzo silnie wpływa na tempo wzrostu bakterii jest temperatura. W przypadku tego czynnika, należy zaznaczyć, iż każdy gatunek bakterii ma inną optymalną temperaturę wzrostu. Dla każdego gatunku bakterii, bowiem wyróżniamy trzy temperatury kardynalne, pierwszą z nich jest temperatura minimalna, poniżej, której wzrost bakterii ulega zupełnemu zatrzymaniu. Następną temperaturą jest temperatura optymalna, w której następuje najszybsze rozmnażanie się bakterii, natomiast trzecią jest temperatura maksymalna, powyżej której bakterie przestają rosnąć i namnażać się [2, 9].

Bakterie mają zdolności adaptacyjne do niskich oraz wysokich temperatur otoczenia, jedne z nich mogą występować w temperaturze  $-23^{\circ}\text{C}$ , inne w temperaturze  $+117^{\circ}\text{C}$ . U poszczególnych gatunków różnica pomiędzy temperaturą maksymalną a minimalną wynosi nawet od  $10$  do  $45^{\circ}\text{C}$ . Grupę bakterii zdolnych do życia poniżej  $-20^{\circ}\text{C}$  zalicza się do ogólnej grupy zwanej psychrotrofami. Występują one w morzach podbiegunowych, a ich błona komórkowa zawiera dużo nienasyconych kwasów tłuszczowych, nieregularnie rozgałęzionych [9]. Wzrost mikroorganizmów psychrofilnych (zimnolubnych) w niskich temperaturach jest uwarunkowany również aktywnością enzymów katalizujących reakcje metaboliczne w tych temperaturach. Kolejną grupą bakterii są bakterie mezofilne, które rozwijają się w temperaturze od  $15$  do  $45^{\circ}\text{C}$ . Do grupy tej należą min. bakterie będące patogenami człowieka oraz zwierząt. Wyróżniamy również drobnoustroje termofilne (termofile - ciepłolubne), które charakteryzują się wysoką optymalną temperaturą wzrostu, przekraczającą  $45^{\circ}\text{C}$ , choć niektóre z nich najlepiej rosną w temperaturze znacznie wyższej np. powyżej  $80^{\circ}\text{C}$  i są to ekstremalne termofile, czyli hypertermofile [7]. Ich głównymi cechami budowy jest błona komórkowa bogata w nasycone kwasy tłuszczowe, fosfolipidy i karotenoidy. Cechą charakterystyczną tych bakterii jest obecność białek szoku cieplnego (HSP – ang. *Heat shock proteins*), które stabilizują struktury białek komórkowych, a także RNA zawierające więcej cytozyny i guaniny [9].

Metoda XPS była używana już wcześniej do analizowania chemicznego składu powierzchni komórek mikroorganizmów [91, 92, 94, 95, 115-117]. W dostępnej literaturze brakuje jednak danych dotyczących wpływu czynników środowiskowych na strukturę i skład chemiczny zewnętrznych powierzchni mikroorganizmów. W celu monitorowania zmian chemicznych i morfologicznych na powierzchni ścian komórkowych bakterii hodowanych w różnych temperaturach wykonano badania bakterii *B. subtilis* i *E. coli*. Wszystkie linie XPS otrzymane dla bakterii hodowanych w optymalnej temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  dla obu bakterii, zarówno Gram-dodatnich *B. subtilis*, jak i Gram-ujemnych *E. coli* były węższe, od tych

hodowanych w warunkach suboptymalnych (20°C). Świadczy to o tym, iż w temperaturze 37°C biopolimery tworzące ścianę komórkową tych mikroorganizmów mają bardziej uporządkowaną budowę, a rozwój ich struktur podczas wzrostu został zakończony. Potwierdzeniem jest brak dodatkowych linii, które mogą świadczyć o defektach powierzchni. Dzięki specyficznym właściwościom ścian (i błon) komórkowych bakterii, pod wpływem odmiennej temperatury hodowli, ich skład chemiczny ulegał również zmianie, co widoczne jest na wynikach otrzymanych techniką XPS.

Uzyskane widma XPS jednoznacznie pokazują, że temperatura, w której hodowano bakterie ma istotny wpływ na skład chemiczny powierzchniowych struktur komórek bakterii. Widma szczegółowe XPS dla poszczególnych linii poziomów rdzenia przebadanych bakterii hodowanych w optymalnej temperaturze 37°C po dopasowaniu liniami syntetycznymi, w przypadku węgla (C1s) wskazywały cztery składowe, o zbliżonej energii wiązania, ale różnej intensywności. Oznacza to, że pierwiastek ten wchodził w skład różnych związków chemicznych. Pierwsza z linii odpowiadała wiązaniom C-C i C-H w łańcuchach alifatycznych (285.0 eV), kolejna linia pochodziła od pojedynczych wiązań węgla z tlenem i węgla z azotem (C-O i C-N), zawierających eter, alkohol, aminy i amidy, przy energii wiązania  $286.5 \pm 0.5$  eV. Trzecia linia, która znajdowała się przy  $288.0 \pm 0.5$  eV, wynikała z obecności podwójnego wiązania węgla z tlenem C=O, występującego w peptydach i białkach. Zawiera ono także amidy karbonylowe, karboksylany, estry i acetyle. Ostatnia linia pochodziła od wiązania karboksylowego COOH ( $289.0 \pm 0.5$  eV), które występuje licznie w białkach ściany komórkowej bakterii [107, 118, 119].

Największy wkład w skład ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich *B. subtilis* dawały grupy węglowodorowe, które występują w aminokwasach i lipidach oraz kolejno wiązania węgla pojedynczo związanego z tlenem lub atomem azotu, a także grupy karbonylowe, stanowiące bardzo ważny składnik peptydoglikanu. W rzeczywistości układy natury biologicznej są zdominowane przez trzy główne klasy związków: białka i peptydy, cukry i polisacharydy oraz lipidy i węglowodory, każdy z ograniczoną liczbą funkcji chemicznych [92, 111].

Kolejnym składnikiem głównym, zidentyfikowanym w badanych bakteriach i zasługującym na omówienie, jest linia O1s tlenu. Po jego rozseparowaniu ustalono, iż składa się on, podobnie jak węgiel, z wielu związków chemicznych, o czym świadczy podział na kilka singletowych linii (dopasowanie 3, 4 składowymi). Wynikają one z obecności złożonej struktury linii poziomów rdzenia dla tego pierwiastka. Pierwsza z linii wykrytych u bakterii z gatunku *B. subtilis* oraz *E. coli*, hodowanych w optymalnej temperaturze 37°C,

o najmniejszej energii wiązania, tj.  $531.8 \pm 0.4$  eV, pochodzi od grupy karbonylowej, składającej się z atomu tlenu połączonego wiązaniem podwójnym z atomem węgla  $O=C$ . Grupa ta występuje w wielu typach związków organicznych i wchodzi w skład kwasów karboksylowych, karboksyli, esterów, karbonyli i amidów. Następną linię została utworzona przez fotoelektrony pochodzące od tlenu związanego pojedynczo z węglem lub azotem  $O-(C, N)$  i pojawiła się przy wyższych energiach wiązania, około  $533.0 \pm 0.4$  eV. Kolejna, trzecia linia pochodzi od grupy karboksylowej  $COOH$  przy energii wiązania równej  $534.7 \pm 0.4$  eV. Podobne wyniki otrzymywało wielu autorów [91, 119-122]. W linii tej pojawił się w hodowli prowadzonej w  $20^{\circ}C$  u *B. subtilis* sygnał z wody, przy dość wysokiej energii wiązania równej  $535.4$  eV.

Linie azotu  $N1s$  rozkładały się przeważnie na trzy składowe, zarówno u *B. subtilis*, jak i *E. coli*. Te o małym natężeniu, znajdujące się przy energii wiązania około  $399.0 \pm 0.5$  eV, pochodziły od pojedynczego wiązania azotu z węglem ( $N-C$ ). Nie pojawiło się ono jedynie w próbce hodowanej w temperaturze optymalnej  $37^{\circ}C$  w *E. coli*. Druga z linii, o największej intensywności, znajdowała się przy  $400.1 \pm 0.3$  eV i zawierała nieprotonowaną grupę aminową lub amidową. Ostatnia z nich, przy najwyższej energii wiązania wynoszącej  $401.6 \pm 0.3$  eV pochodziła od sprotonowanej grupy aminowej lub amidowej, przy czym w literaturze zwykle linia azotu dla *B. subtilis* rozkładana była tylko na dwie składowe, z pominięciem wiązania  $N-C$ , gdyż zwykle w optymalnych warunkach pojawiało się ono w śladowej ilości, nie przekraczając 1% intensywności [123].

Struktura elektronowa, po dokładnej analizie linii syntetycznych  $C1s$  i  $O1s$  dla obu przebadanych gatunków bakterii *Bacillus* i *Escherichia*, hodowanych w temperaturze optymalnej ( $37^{\circ}C$ ) różniła się dość znacznie udziałem głównych grup funkcyjnych. Widać to wyraźnie w intensywności stężenia wiązania  $C-(C, H)$  oraz  $C=O$ , obliczonego w stosunku do całkowitej zawartości wykrytego węgla. Grupa węglowodorowa w stosunku do węgla u *B. subtilis* w  $37^{\circ}C$  wynosiła 27,49%, zaś zawartość grupy  $C=O/C$  stanowiła 11,51% (Tab. 13). U bakterii *E. coli*, w tej temperaturze, wiązanie węglowodorowe wynosiło aż 37,09%, a grupy karbonylowej 5,30% (Tab. 18). Ze względu na obecność grubej warstwy peptydoglikanu u bakterii Gram-dodatnich (*B. subtilis*), zawartość polisacharydów i peptydów jest wyższa niż w przypadku bakterii Gram-ujemnych (*E. coli*), stąd większa zawartość u tych pierwszych grupy  $C=O$ . Z kolei, zawartość grupy  $C-(O, N)$ , we wszystkich próbkach jest zbliżona (*B. subtilis* 23,01%, u *E. coli* 21,20%), chociaż u bakterii hodowanych w  $20^{\circ}C$  różnica ta jest większa (16,63 u *B. subtilis* i 24,48 u *E. coli*). Podobne zależności obserwował Kern i wsp. (2010) [124]. Związki węglowodorowe natomiast odpowiadają



związkom lipidowym, do których należą fosfolipidy i kwasy lipotejchowe. Błony zewnętrzne bakterii Gram-ujemnych, składają się z warstwy fosfolipidów, dlatego też, najwyższą zawartość związków węglowodorowych, równą 37,09%, obserwowano u bakterii *E. coli*.

Według Hamadi i współpracowników hydrofilowość powierzchni komórek związana jest z wysoką zawartością w niej takich grup funkcyjnych jak C-(O, N) i OH-(C-O-C), zaś hydrofobowość powierzchni komórek bakterii wiąże się z większą obecnością węglowodorowych grup funkcyjnych C-(C, H), nie zaś jak sądzono grup C=O lub też z wysokiego stosunku N/C, wskazującego na obecność białka i peptydów w komórce [117, 121, 125]. Wysoka zawartość wiązania węglowodorowego w ścianie komórkowej bakterii powoduje również wzrost ich przyczepności [121, 123]. Wspólne jest natomiast stanowisko wszystkich autorów co do hydrofilowego charakteru powierzchni bakterii, na które ma wpływ zawartość polisacharydów w zewnętrznej warstwie komórki, czyli obecność przede wszystkim grupy funkcyjnej C-(O, N) [117, 121, 123]. Ponadto, można zauważyć, że suma polisacharydów u bakterii Gram-dodatnich w temp. 37°C jest stosunkowo wyższa (o 6,38%) niż ich zawartość u bakterii hodowanych w 20°C. Zawartość natomiast grupy karboksylowej COOH maleje równocześnie ze wzrostem zawartości grupy polisacharydowej, co również związane jest ze zmianą hydrofobowości powierzchni komórek [117]. Sugeruje to, że powierzchnia badanych bakterii *B. subtilis* w temp. optymalnej wykazuje lepsze właściwości adhezyjne, tym samym zmieniają się one wraz ze zmianą na niekorzystne warunki środowiskowe. Zatem, otrzymane wyniki pokazały, że właściwości powierzchniowe bakterii są procesem dynamicznym, zależnym w pewnym stopniu od warunków temperaturowych hodowli. Możemy w ten sposób modyfikować powierzchnie bakterii poprzez działanie na nie różnych czynników fizycznych, które np. zwiększają polarność i energię powierzchniową, co prowadzi do zmiany ich właściwości hydrofobowych na hydrofilowe, powodując powstawanie grup funkcyjnych zdolnych do tworzenia połączeń fizycznych i chemicznych z innymi substancjami lub materiałami.

Udziały grup funkcyjnych określone przez XPS dla pierwiastka węgla, w przypadku *E. coli*, pokazują stosunkowo dużą część linii C1s obecną w grupie funkcyjnej C-(C, H). Obserwacje te pokrywają się z wynikami uzyskanymi przez Hamadi i in. (2008) [121]. Silne właściwości hydrofobowe powierzchni wpływają na autoagregację komórek bakteryjnych, co oznacza wyższy stopień przywierania do hydrofilnych powierzchni. U bakterii hodowanych w temp. 20°C spadło stężenie związków zawierających grupy węglowodorowe z 37,09% do 31,28% oraz karboksylowe z 2,65% do 2,04%, tym samym ich hydrofobowość

zmniejszyła się. Świadczy to o wyraźnym wpływie temperatury na ich właściwości powierzchniowe. W tej temperaturze natomiast wzrosła zawartość ujemnie naładowanych polisacharydów, czyli grupy C-(O, N), która u bakterii Gram-ujemnych pełni dużą rolę w budowie EPS, czyli bakteryjnych polimerów pozakomórkowych, odpowiadających między innymi za powstawanie i dojrzewanie biofilmu.

W przypadku pierwiastka tlenu u bakterii z gatunku *B. subtilis* w obu temperaturach dominowało wiązanie O=C występujące w dużej ilości w peptydach (13,39% w 37°C i 11,93% w 20°C), natomiast u *E. coli* było to pojedyncze wiązanie tlenu z węglem lub azotem O-(C, N), równe 19,49% w optymalnej temperaturze oraz 15,59% w 20°C. Wszystkie dane obliczono poprzez stosunek procentowy typów wiązań tworzonych przez dany pierwiastek do całkowitej zawartości powierzchni linii węgla lub tlenu w mierzonej próbce. Różnice te mogą wynikać głównie z różnej budowy ściany komórkowej między tymi dwoma rodzajami bakterii. Mureina stanowi, bowiem od 40% do nawet 90% suchej masy ściany komórkowej u bakterii Gram-dodatnich, do których należy *B. subtilis*, natomiast u bakterii Gram-ujemnych, do których zaliczają się pałeczki jelitowe *E. coli*, warstwa peptydoglikanu jest znacznie cieńsza i stanowi zaledwie 2 do 3 warstwy.

Najciekawsze wyniki uzyskano jednak dla badanych bakterii hodowanych w temperaturze 20°C. Analiza uzyskanych widm z bakterii inkubowanych w tej temperaturze przez 24 godziny wykazała, że w strukturze linii węgla i tlenu pojawiły się dodatkowe, niezidentyfikowane linie [126]. Intensywność tych linii w przypadku *B. subtilis*, dla grup funkcyjnych w linii węgla wynosiła 10%, natomiast w linii tlenu aż 24%. U bakterii *E. coli* dodatkowa linia w C1s stanowiła 6% i 5% w linii O1s. Pojawiły się one przy energiach wiązania dla C1s równych około  $283.6 \pm 0.4$  eV oraz dla O1s przy  $530.4 \pm 0.4$  eV. Ich pojawienie się interpretowane jest, jako defekty powierzchni, które są wynikiem niepełnego wykształcenia ściany komórkowej pod wpływem stresu spowodowanego suboptymalnymi warunkami hodowli. Zjawisko to zachodzi wtedy, gdy bakterie tego samego gatunku hodowane są w temperaturze o kilkanaście stopni niższej od temperatury optymalnej dla danego szczepu mikroorganizmu. Dochodzi wówczas do specyficznych chemicznych interakcji prowadzących do powstania dodatkowych wiązań w niskich energiach wiązania [126]. Od temperatury zależny jest, zatem stan fizykochemiczny struktur związków organicznych na powierzchni bakterii. Szybkość większości reakcji chemicznych wzrasta, bowiem dwa do trzech razy przy podniesieniu temperatury już o 10°C [127]. Temperatura 37°C stwarzała najdogodniejsze warunki wzrostu i rozwoju obu przebadanych gatunków bakterii, co objawia się również w uporządkowaniu ich struktur komórkowych.

Obliczenie procentowej zawartości typów wiązań w całkowitej procentowej zawartości węgla i tlenu, w ścianie komórkowej bakterii inkubowanych w różnych temperaturach, miało za zadanie zobrazowanie zmienności występowania poszczególnych grup funkcyjnych danego pierwiastka w zależności od tego czynnika. Obecność dodatkowych, obcych sygnałów w postaci niezidentyfikowanych linii potwierdza, że temperatura otoczenia jest jednym z najważniejszych czynników środowiskowych wpływających na skład chemiczny powierzchni bakteryjnych struktur komórkowych. Tym samym, świadczy to o tym, iż bakterie potrafią odczuwać temperaturę środowiska, co warunkuje nie tylko określoną szybkość ich wzrostu, ale również modyfikację składu chemicznego powierzchniowych warstw komórkowych. Rozwój komórki bakteryjnej i jej ściany komórkowej jest, zatem w dużej mierze regulowany informacjami napływającymi z otaczającego środowiska [128].

Na podstawie danych uzyskanych metodą XPS obliczono także stosunek koncentracji O/C, N/C i P/C powierzchniowych stężeń atomów dla obu badanych szczepów bakterii (*B. subtilis* i *E. coli*). Wszystkie różnice w intensywnościach, jak i zawartościach poszczególnych grup funkcyjnych oraz pierwiastków pomiędzy badanymi dwoma gatunkami bakterii wynikały z odmiennej chemicznej budowy struktury ich ściany komórkowej. Wynikiem tego jest przede wszystkim o rząd wielkości mniejszy wskaźnik koncentracji N/C dla *E. coli* (bakteria Gram-ujemna), który wynosi 0,07 w obu temperaturach hodowli, w odróżnieniu od bakterii z gatunku *B. subtilis* (Gram-dodatnia), którego wartość wahała się w zakresie od 0,12 w 20°C do 0,19 w 37°C. Stosunek ten zależny był od ilości peptydów w zewnętrznej warstwie bakterii, co spowodowane było grubszą warstwą peptydoglikanów w ścianie komórkowej bakterii Gram-dodatnich. Największą koncentrację atomową wykazano dla tlenu i węgla, gdzie obserwowane dla obu szczepów bakterii stosunki koncentracji O/C były bardzo wysokie i wynosiły u *B. subtilis* od 0,34 w temp. optymalnej i wzrosły do 0,45 w 20°C. U *E. coli* hodowanych w temperaturze niższej nastąpił nieznaczny spadek tego wskaźnika z 0,41 do 0,38. Może to być związane z pojawieniem się polisacharydów otoczkowych na powierzchni ich ściany komórkowej, komórkę prokariotyczną, bowiem od środowiska zewnętrznego osłania ściana komórkowa, na której powierzchni występuje dodatkowo otoczka śluzowa [91]. W odpowiedzi na różne warunki wzrostu i bodźce zewnętrzne bakterie zmieniają skład chemiczny otoczek i zewnętrznej sztywnej warstwy peptydoglikanu. W konsekwencji zmiany te mogą wpływać na interakcje między komórkami bakterii, jak również pomiędzy powierzchnią komórek i innymi powierzchniami [122]. Ponadto, zauważono iż zawartość białka lub też peptydów (atomowy

wskaźnik koncentracji N/C) zwykle wzrasta równocześnie ze zmniejszeniem zawartości polisacharydów, czyli wskaźnika koncentracji O/C. Tak stało się w przypadku bakterii z rodzaju *Staphylococcus* (*S. sciuri*, *S. equorum*) oraz *B. subtilis*. Te modyfikacje związane były ze zmianą hydrofobowości powierzchni komórki oraz ich adhezji, co wskazuje na udział białek powierzchniowych w tych procesach [117]. Zatem stosunek N/C zależny jest od ilości białka, czy też peptydów na powierzchni komórki i wskazuje na jej hydrofobowy charakter oraz dodatni ładunek powierzchniowy, natomiast większa wartość współczynnika O/C sugeruje na bardziej hydrofilowy charakter powierzchni komórek i tym samym ich ujemny ładunek [117]. Jako, że powierzchnia większości bakterii naładowana jest ujemnie, wiele struktur powierzchniowych, jak białka czy lipidy, mogą podnosić ich hydrofobowość. Ciekawy wynik dotyczy również wskaźnika P/C, gdyż gatunki te mimo różnej budowy ściany komórkowej mają podobny stosunek tego wskaźnika, równy 0,01, jedynie w przypadku bakterii *B. subtilis* hodowanej w 20°C wzrósł on do 0,03.

Bezpośrednie porównanie uzyskanych wyników XPS z wartościami otrzymanymi przez innych autorów nie jest możliwe, ponieważ w opublikowanych pracach do hodowli bakterii wykorzystywano różne podłoża mikrobiologiczne, a przed analizą bakterie były poddawane procesowi liofilizacji. Poza tym, całość właściwości powierzchni bakterii nie jest jeszcze do końca poznana i dlatego w pracach badawczych najczęściej opisywane są one w szczątkowy sposób, określając jedynie kilka różnych cech związanych z powierzchnią i jej strukturami, takich jak ładunek powierzchni, czy zdolność adhezji do komórek gospodarza.

Obok temperatury, stężenie jonów wodorowych (pH) należy do najważniejszych czynników fizycznych, wpływających na procesy metaboliczne oraz rozwój i wzrost drobnoustrojów [119, 122, 129]. Dla większości bakterii optymalne pH środowiska wynosi około 7, czyli rosną one najlepiej w środowisku obojętnym. Duża część z nich jest, zatem neutrofilami (obojętnolubne). Alkalofile natomiast najlepiej rosną w środowisku zasadowym (pH powyżej 8) i znaleźć je można przeważnie w naturalnych zasadowych jeziorach, a także w ściekach z przemysłu przetwórstwa ziemniaczanego. Bakterie osiągające maksimum wzrostu w środowisku kwaśnym (pH 5 oraz niższe) nazywane są acydofilami i tego typu mikroorganizmy żyją w wodach i ściekach kopalnianych, a także w niektórych gorących źródłach [7]. Niektóre rodzaje drobnoustrojów wykazują bardzo dużą wrażliwość na zmiany stężenia jonów wodorowych i rozwijają się w bardzo wąskim zakresie pH. Przykładem takich bakterii wrażliwych na zmiany pH jest m. in. *E. coli*, wykorzystana w przedstawionych

badaniach. Potwierdzeniem dużej wrażliwości tej bakterii na pH środowiska był brak jej wzrostu na podłożach o pH równym 5 oraz 9.

Badania XPS powierzchni bakterii *B. subtilis* hodowanych przez 24 godziny na podłożach o pH 5 i 9 wykazywały natomiast niewielkie różnice, gdyż występowały u nich identyczne wiązania o zbliżonych intensywnościach. W obu próbkach dominujący udział miało wiązanie C-(C, H) w linii C1s, ponieważ stanowiło ono ponad połowę intensywności w stosunku do innych wykrytych grup funkcyjnych (w pH 5 wynosiło ono 63%, czyli w stosunku do całkowitej zawartości węgla 44,80%, natomiast w pH 9 – 54%, czyli 37,13% w wykrytym węglu). Tutaj również zawartość grupy węglowodorowej i karboksylowej wzrastała równocześnie ze zmniejszeniem zawartości polisacharydów na powierzchni próbki. Zawartość grupy COOH natomiast w stosunku do całkowitej zawartości wykrytego węgla w pH 5 wynosiła 2,13% i spadła w pH 9 do 1,36%, zaś grupa C-(O, N) w pH 5 wynosiła 16,36%, a w środowisku alkalicznym wzrosła do 20,63%. Z badań wynika tym samym, iż środowisko kwasowe powoduje zwiększenie hydrofobowości powierzchni komórek bakterii *B. subtilis*. W przypadku linii O1s dominującym wiązaniem w obu preparatach było wiązanie O-(C, N), również przekraczające o ponad połowę inne wiązania swoją intensywnością (w pH 5 wynosiło 55%, w pH 9 – 61%). Nie zanotowano natomiast obecności grupy COOH, ale zamiast tego w obu próbkach pojawiła się woda od 3 do 4%. Uzyskane wyniki wskazują, zatem, że określone stężenia jonów wodorowych w podłożu hodowanym mogą powodować wzrost lub spadek syntezy takich struktur powierzchniowych, jak polisacharydy, białka czy lipidy, które zmieniają właściwości hydrofobowe powierzchni, wpływając tym samym na autoagregację komórek bakteryjnych [125]. Dodatkowo, stwierdzono niski wskaźnik koncentracji atomowej O/C w porównaniu z bakteriami tego samego gatunku hodowanego w różnych temperaturach, a wskaźnik N/C w obu środowiskach był równy 0,08. Poza tym, po dopasowaniu liniami syntetycznymi linii C1s i O1s dla obu środowisk nie stwierdzono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy występującymi grupami funkcyjnymi, a składem podłoża hodowanego. Jedynie w linii azotu N1s pojawiły się prócz nieprotonowanej grupy aminowej przy  $399.9 \pm 0.3$  eV i protonowanej grupy aminowej, znajdującej się przy  $401.5 \pm 0.3$  eV, dodatkowe linie przy dość niskich energiach wiązania, wynoszących  $397.5 \pm 0.2$  eV. Ich intensywności były bardzo małe i nie przekraczały zwykle 4%. Pojawienie się ich w próbkach, w obu odczynach środowiska hodowanego związane było z tym, iż optymalne wartości pH dla większości rodzajów bakterii mieszczą się w pobliżu odczynu obojętnego [130]. Zatem niewielkie zmiany składu chemicznego na powierzchni *B. subtilis* obserwowano przy pH powyżej, jak również poniżej optymalnej wartości. Pojawienie się

natomiast dodatkowego wiązania spowodowało zniknięcie linii pochodzącej od pojedynczego wiązania azotu z węglem w linii N1s.

Prowadzone w ramach przedstawionej pracy badania obejmowały także obserwacje modyfikacji topografii powierzchni bakterii, które możliwe były do zaobserwowania za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej. Mimo iż, technika ta jest jedną z najbardziej podstawowych metod obrazowania i diagnozowania elementów środowiska, jednak badania struktury obiektów biologicznych za pomocą SEM z zastosowaniem specjalnego stolika mrozącego Cryo z ciekłym azotem, należą do pionierskich i traktowane były eksperymentalnie. Preparaty biologiczne, ze względu na swą delikatną budowę i znaczną zawartość wody, przed obserwacjami w mikroskopie elektronowym, bez funkcji mrożenia, wymagały skomplikowanej i swoistej preparatyki do badań. Polegała ona przede wszystkim na utrwaleniu chemicznym struktury materiału, następnie płukaniu, utrwaleniu wtórnym (osmowaniu), odwadnianiu w szeregu acetonowym lub alkoholowym oraz zatapianiu w substancjach o wysokiej sztywności, np. w żywicach akrylowych i epoksydowych [131]. Skutkowało to skurczeniem i zniekształceniem próbki lub też usunięciem materiałów rozpuszczalnych z ich powierzchni (np.: woski). Negatywny wpływ na strukturę żywych komórek ma też, nieustanne działanie skupionej w jednym punkcie wiązki elektronów o wysokim napięciu. W przeciwieństwie do utrwalania chemicznego, utrwalanie fizyczne przez szybkie zamrażanie w ciekłym azocie pozwala zachować naturalną strukturę wszystkich składników komórkowych badanego obiektu, bez specyficznych i czasochłonnych przygotowań [132, 133]. Tym samym, słabo przewodzące i silnie uwodnione obiekty, jak fragmenty świeżych liści, czy bakterie, mogą być oglądane bez wcześniejszej, czasochłonnej, skomplikowanej i kosztownej, ze względu na chemiczne odczynniki obróbki. Metoda z zastosowaniem tak niskiej temperatury (-196°C) stabilizuje badane struktury, umożliwiając obserwację powierzchni próbek w ich jak najbardziej naturalnym stanie, bez szeregu uprzednich czynności przygotowawczych, prowadzących do powstawania niepożądanych artefaktów, związanych z ich deformacją w wysokiej próżni mikroskopowej [84, 134]. Innowacyjność, zatem zastosowanej metody Cryo-SEM polegała głównie na tym, iż eliminuje ona potrzebę długotrwałego przygotowywania próbek biologicznych, jakim jest między innymi suszenie w punkcie krytycznym CPD z ang. *Critical Point Drying* [135]. Jednak do badania w pełni nienaruszonej chemicznie struktury powierzchniowej obiektów biologicznych w mikroskopie potrzebne było opracowanie szczegółowej metodyki postępowania z próbkami, w celu obserwacji ich topografii powierzchni. Z biegiem czasu była ona udoskonalana doświadczalnie (wykonywanie przekrojów bakterii specjalnym

nożem, odpowiedni czas sublimacji, napylenie odpowiednią grubością warstwy platyny), aby uzyskać wysokorozdzielcze obrazy w dużych powiększeniach, a tym samym otrzymać jak najwięcej informacji o badanym materiale.

Mikroskop elektronowy z funkcją Cryo jest urządzeniem doskonale nadającym się do obserwacji delikatnych, uwodnionych powierzchni mikroorganizmów i materiałów biologicznych na poziomie ich morfologii i ultrastruktury, z precyzją nieosiągalną innymi technikami [136]. Metoda zamrożeniowa w warunkach *in situ* bez jakiegokolwiek procedury chemicznej umożliwiła obserwację nienaruszonej struktury powierzchniowej bakterii różnych gatunków. Zauważalne na mikrofotografiach wypukłości komórek możliwe są do zaobserwowania tylko dzięki ich szybkiemu zamrożeniu, zatem obraz przedstawia bakterie w ich naturalnym stanie uwodnionym, czyli jest tożsamy z ich rzeczywistym wyglądem. Oprócz kształtu i wielkości komórek, na mikrofotografiach widoczny jest również egzopolisacharydowy biofilm, który wytworzył się na powierzchni bakterii. Powoduje on, że są one zbite w jedną całość, gdyż wypełnia on przestrzeń pomiędzy komórkami, jak np.: w przypadku bakterii *Staphylococcus* sp. odnotowano również obrazy SEM o zmienionym zarysie struktur powierzchniowych, gdzie na powierzchni bakterii *S. equorum* widoczne były najprawdopodobniej pozostałości po mrożeniu materiału w ciekłym azocie. Przydatność tej metody przygotowywania próbek, z pominięciem procedury chemicznego utrwalania, stosowanej w tradycyjnej mikroskopii elektronowej, pokazują prace Dohnalkova i in. (2011) oraz Alhede i in. (2012) [137, 138].

Uzyskane obrazy drobnoustrojów w wysokiej rozdzielczości, wykonane za pomocą mikroskopu elektronowego, są szczególnie użyteczne do charakterystyki ich powierzchni [139]. Najciekawsze obserwacje w pracy zanotowano dla bakterii z rodzaju *Bacillus*. Po przecięciu komórek bakterii *B. cereus* i *B. mycoides* ujawniono nieobserwowane dotąd struktury. Sytuacja ta powtarzała się kilkakrotnie, natomiast dyskusja uzyskanych wyników jest utrudniona ze względu na brak danych literaturowych z tego zakresu. Ich obecność wymaga natomiast dalszego wyjaśnienia.

Dzięki analizie mikroskopowej wykazano pewne różnice strukturalne w morfologii powierzchni bakterii hodowanych w dwóch różnych temperaturach. Załączona dokumentacja fotograficzna przedstawia mikrostrukturę bakterii, a także ich przestrzenną konfigurację. Na obrazie przedstawiającym bakterie hodowane w temperaturze 37°C (Rys. 67a), czyli w temperaturze optymalnej dla *B. subtilis* zauważono, iż ich powierzchnia jest jednolita i gładka. Poszczególne laseczki połączone są warstwą śluzu. Jest to związane z tym, iż badane bakterie to szczepy otoczkowe, które wytwarzają na podłożu stałym kolonie gładkie.

U bakterii z tego gatunku hodowanych w temp. 20°C (Rys. 67b) zauważono, iż powierzchnia komórek wyraźnie uległa zmianie. W tej temperaturze powierzchnia tych bakterii stała się bardziej szorstka i widoczne były na niej wyraźne granule [126]. Bakterie pokryte były w tym przypadku najprawdopodobniej warstwą śluzu, który miał na celu ich ochronę przed niesprzyjającymi czynnikami fizycznymi. Świadczy o tym wyraźna zmiana struktury cienkiej śluzowej otoczki na powierzchni bakterii *B. subtilis* poniżej optymalnej temperatury hodowli. Wyniki te wskazują, iż synteza otoczek, mimo iż jest uwarunkowana genetycznie, zależna jest także od warunków zewnętrznych [10].

Skaningowa mikroskopia elektronowa umożliwia również zmierzenie długości oraz szerokości bakterii danego gatunku. Uzyskane wyniki pokazują, że nie tylko ich powierzchnia uległa przemianie. Temperatura miała również wpływ na wielkość komórek, ponieważ bakterie *B. subtilis* hodowane w optymalnej temperaturze, były dłuższe o ok. 1 µm i cieńsze o ok. 0,3 µm, od tych hodowanych przez ten sam okres czasu w suboptymalnych warunkach temperaturowych [126].

W przypadku *E. coli* również obserwowano różnice w strukturze powierzchni między komórkami bakterii hodowanymi w temperaturze 37 i 20°C. Odnaczają się one zróżnicowaną wrażliwością na czynniki fizyczne i chemiczne, ponieważ potrafią przeżywać przez kilka miesięcy w wodzie czy kale, w temperaturze 0°C. Nie bez znaczenia jest tu również fakt wydzielania przez te bakterie na zewnątrz komórki egzopolisacharydów, znanych także, jako EPS (ang. *extracellular polymeric substances*). Są one słabo lub w ogóle niezwiązane z komórką mikroorganizmu i występują głównie w postaci śluzu. Biopolimer ten składa się przede wszystkim z polisacharydów i białek. Wiele szczepów *E. coli* wytwarza charakterystyczny EPS, nazywany kwasem kolaninowym lub antygenem M, który zbudowany jest z takich węglowodanów jak glukoza, galaktoza oraz fukoza. Jego wzmożona synteza zwykle zachodzi w temperaturze poniżej 30°C i pełni ważną rolę w tworzeniu biofilmów przez ten gatunek bakterii w środowisku naturalnym [140]. Ten fakt potwierdziła zwiększona zawartość grupy C-(O, N) na powierzchni komórek bakterii *E. coli* hodowanych w 20°C (z 21,20% do 24,48%) oraz nieznacznie podniesiona zawartość grupy C=O (z 5,30% do 6,12%).

Na mikrofotografii przedstawiającej pałeczki *E. coli* hodowane w temperaturze 37 i 20°C można było zauważyć, iż poszczególne komórki są zatopione w egzopolisacharydzie. Warunkuje on wzajemne przyleganie tych bakterii do siebie, co skutkuje utworzeniem mikrokolonii, zamkniętej w śluzowatej matrycy bakteryjnych polimerów pozakomórkowych. Skupiska komórek bakteryjnych na mikrofotografii przedstawiającej hodowle w 20°C,



są bardziej poroździelane przez „kanały wodne”, którymi przepływają płyny ustrojowe i transportowane są substancje odżywcze oraz tlen potrzebny do wzrostu komórek bakteryjnych, a także produkty ich metabolizmu [141].

Porównanie wyników badań otrzymanych ze skaningowego mikroskopu elektronowego obu rodzajów bakterii *B. subtilis* oraz *E. coli* hodowanych w takich samych warunkach temperaturowych (37°C i 20°C) pokazało, iż optymalna temperatura syntezy egzopolisacharydów przez bakterie z rodzaju *Bacillus* w odróżnieniu od *E. coli* to około 36-44°C. Z reguły otoczka u tych bakterii zbudowana jest z aminokwasów, mieszaniny izomerów D i L kwasu glutaminowego [142]. Być może, w temperaturze hodowli 20°C zmiany w strukturze otoczek powodowały, że powierzchnia komórkowa *B. subtilis* stała się bardziej szorstka. Szczep ten być może nie wytwarzają efektywnie pozakomórkowo egzopolisacharydów poniżej optymalnego zakresu temperatury. Bakterie Gram-ujemne są najprawdopodobniej bardziej wrażliwe na niskie temperatury niż bakterie Gram-dodatnie, ponieważ bardzo trudno było dojrzeć w przypadku bakterii *E. coli* pojedyncze komórki, natomiast dobrze widoczna była jedynie macierz zewnątrzkomórkowych polimerów (EPS), pokrywająca kolonię bakterii. Bakteryjne polimery pozakomórkowe EPS, bowiem w zależności od gatunku bakterii, mogą stanowić od 50% do 90% całkowitej masy mikrokoloni [141]. W głębszych warstwach biofilmu komórki mają mniejszy dostęp do składników odżywczych i tlenu, w związku z tym, aby przetrwać w tych warunkach muszą się dostosować, poprzez zmianę swojej fizjologii i zmniejszenie tempa wzrostu, przechodząc tym samym w stan zbliżony do anabiozy [8].

Znajomość właściwości powierzchni bakterii zmieniających się pod wpływem różnych czynników zewnętrznych jest niezbędna do zrozumienia interakcji pomiędzy nimi a środowiskiem, w którym występują [110]. W przypadku badań mikroskopowych przeprowadzonych dla bakterii hodowanych na podłożach o zróżnicowanym pH (5 i 9), pomiary SEM pozwoliły na zobrazowanie różnic w ich morfologii. Dla bakterii z rodzaju *B. subtilis* najbardziej optymalne warunki hodowli to pH równe około 6-7. Mimo to, szczep ten wykazywał również dobry wzrost na pożywkach przy pH równym 9, co może świadczyć o tym, że toleruje on również zasadowy odczyn podłoża [142]. Charakter różnic w mikrostrukturze powierzchniowej tych bakterii był podobny jak w przypadku badań tych bakterii prowadzonych w różnych temperaturach, jednak ich skala była mniejsza. Tu także zaobserwowano zmianę topografii powierzchni z gładkiej na szorstką u bakterii hodowanych na podłożu o pH 9. Potwierdza to, iż synteza otoczek bakteryjnych w dużym stopniu, zależy od warunków zewnętrznych hodowli danej bakterii, a wynikiem tego jest

zróżnicowanie struktury przestrzennej powierzchni, poprzez zwiększenie jej chropowatości. Różnice te mogły również wynikać ze zwiększonej aktywności metabolicznej, związanej z wydzielaniem peptydowych otoczek przez te bakterie, których funkcją jest stabilizacja przeżywalności bakterii w zależności od stężenia jonów wodorowych (pH) w środowisku.

## 9. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników można wysunąć następujące wnioski:

- Metoda spektrometrii fotoelektronów umożliwiła określenie występowania związków chemicznych na powierzchni bakterii. Dopasowanie linii rdzeniowych liniami syntetycznymi C1s, O1s i N1s pozwoliło na wyznaczenie dominujących grup związków na powierzchni komórek bakterii. W większości przypadków były to wiązania C-(C, H) w linii C1s, wiązanie O-C-H lub też O-(C, N) w linii O1s oraz N<sub>nieprotonowany</sub> w linii N1s.
- Niekorzystne warunki hodowli bakterii prowadziły do pojawiania się dodatkowych linii po dopasowaniu linii syntetycznych w niskich energiach wiązania, co może wskazywać na zaburzenia w syntezie ściany komórkowej. Zmiany, jakie wykazano to poszerzenie linii poziomów rdzenia pierwiastków C, O i N u badanych bakterii.
- W próbkach hodowanych w warunkach optymalnych linie rdzeniowe były węższe, niż u bakterii hodowanych w suboptymalnych temperaturach, co świadczyło o tym, iż struktura elektronowa biopolimerów na powierzchni bakterii wykazywała bardziej uporządkowaną budowę.
- Na podstawie obliczeń atomowych wskaźników koncentracji w odniesieniu do całkowitego węgla (O/C, N/C i P/C) wykazano, że wartość wskaźnika N/C dla bakterii *E. coli* (Gram-ujemna), wskazuje na bardziej hydrofilowy charakter jej powierzchni w porównaniu z komórkami *B. subtilis*.
- Analiza XPS pozwoliła na oszacowanie zawartości podstawowych składników głównych ściany komórkowej badanych bakterii; polisacharydów (grup C-(O, N)), peptydów (grupa C=O) i związków węglowodorowych (grupy C-(C, H)).
- Obserwacje mikroskopowe powierzchni bakterii *B. subtilis* dowiodły, że pH środowiska i temperatura inkubacji, indukują morfologiczne przekształcenia uwodnionych bakteryjnych struktur polimerów zewnątrz komórkowych na powierzchni komórek bakterii.
- Czynniki środowiskowe takie jak: temperatura i pH podłoża mają istotny wpływ na strukturę elektronową powierzchni komórek bakterii, ponieważ optymalne pH i temperatura środowiska gwarantowały utrzymanie prawidłowej budowy morfologicznej komórki oraz zachowanie właściwości ich powierzchni.

## 10. Krótkie streszczenie pracy w języku polskim

**Temat pracy: „Ocena zmian morfologicznych, składu chemicznego i struktury elektronowej powierzchni bakterii z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego oraz spektrometru fotoelektronów”.**

**Justyna Płoszaj-Pyrek, 2016**

**Uniwersytet Śląski, Katowice**

**<sup>1</sup> Wydział Biologii i Ochrony Środowiska**

**<sup>2</sup> Instytut Fizyki im. Augusta Chełkowskiego**

Celem pracy było wykorzystanie nowoczesnych technik fizycznych; spektrometru fotoelektronów wzbudzonych promieniami rentgenowskimi XPS i elektronowego mikroskopu skaningowego SEM z przystawką mrozącą Cryo w badaniach materiałów biologicznych. Materiał badawczy stanowiły bakterie, które izolowane były z powietrza lub pochodziły z kolekcji szczepów bakterii Katedry Mikrobiologii UŚ.

Do analizy powierzchniowych struktur komórkowych bakterii zostały wykorzystane metody stosowane w fizyce materii skondensowanej, a ich użycie w naukach biologicznych pozwoliło uzyskać wiele wartościowych informacji. Metoda XPS w dokładny sposób umożliwiła charakteryzację powierzchni badanych gatunków bakterii, poprzez otrzymanie informacji na temat ilościowego i jakościowego składu pierwiastkowego, intensywności poszczególnych grup funkcyjnych w wiązaniach wchodzących w skład budowy ścian komórkowych badanego szczepu oraz ich przegrupowań. Są one przede wszystkim odpowiedzią komórek na zmieniające się czynniki środowiskowe, w których się rozwijają. W metodzie SEM obejmującej badania materiału biologicznego, w temperaturze poniżej temperatury otoczenia (zwykle od  $-130^{\circ}\text{C}$  do  $-185^{\circ}\text{C}$ ) otrzymano natomiast obrazy powierzchni bakterii, w zakresie powiększeń nawet do 80 000 razy. Pozwoliło to na ocenę topografii, cech mikrostrukturalnych i określenie wielkości wybranych parametrów morfologicznych mikroorganizmów w skali nanometrycznej. Znajomość przemian chemicznych w strukturach zewnątrzkomórkowych bakterii oraz ich morfologii na skutek zmiennych warunków środowiskowych jest niezbędna do zrozumienia oddziaływań między nimi a środowiskiem, w którym występują oraz ma podstawowe znaczenie dla ekologii mikroorganizmów.

Obiektem badań były mikroorganizmy wyizolowane z powietrza pomieszczeń wewnętrznych, takich jak: gabinety dentystyczne i siłownie oraz ze środowiska zewnętrznego oczyszczalni ścieków, znajdujących się na terenie województwa śląskiego. Przedstawiono również wyniki badań monitorowania zmian chemicznych powierzchni ścian komórkowych bakterii dwóch gatunków mikroorganizmów: *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*, hodowanych w różnych temperaturach i pH środowiska. Analiza uzyskanych danych wykazała, iż linie XPS otrzymane dla bakterii hodowanych w optymalnej temperaturze są mniejsze, a grupy funkcyjne są lepiej odróżnialne niż u bakterii hodowanych w warunkach suboptymalnych. Wskazuje to na lepszą, jakość powierzchni ściany komórkowej. Również pojawienie się dodatkowych linii u bakterii inkubowanych w niekorzystnych warunkach świadczyło o niedojrzałości ich ściany komórkowej. Wykazano również zmiany morfologiczne na powierzchni komórek *B. subtilis* hodowanych w temperaturze optymalnej do tych hodowanych w temperaturze suboptymalnej.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że obie użyte fizyko-chemiczne metody badawcze oraz dokładna interpretacja ich wyników umożliwiła otrzymanie kompleksowej informacji na temat badanych próbek i wpływu na nie takich czynników środowiskowych jak temperatura oraz pH podłoża.

## 11. Krótkie streszczenie pracy w języku angielskim

**Ph D Thesis: „Evaluation of morphological changes, chemical composition and electron structure of bacterial surface with the use of scanning electron microscope and X-ray photoelectron spectroscopy”.**

**Justyna Płoszaj-Pyrek, 2016**

**University of Silesia, Katowice, Poland.**

**<sup>1</sup>Department of Biology and Environment Protection**

**<sup>2</sup>August Chelkowski Institute of Physics**

The aim of the study was the use of modern physical techniques to study biological materials. Knowledge of the structure and elemental composition of the bacterial cells surface and the modifications occur in them is important due to the fact that the surface structures of the first contact with the environment, to protect cells from harmful substaces and are involved in interactions between other cells of the bacteria.

The experiments were carried out using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and scanning electron microscope (SEM) equipped with "Cryo-chamber", which gives the possibility of testing biological samples in a frozen state. These methods enabled receiving images of surface topography of the bacteria and demarcated their chemical composition.

This work presents the results of studies on bacteria isolated from the air indoor spaces, such as dental offices and gyms, and the external environment sewage treatment plant, located in the province of Silesia. In addition, the chemical composition of the surface layer of the bacteria and morphological changes were studied in the cell wall bacteria *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* that were grown at different temperatures and different pH.

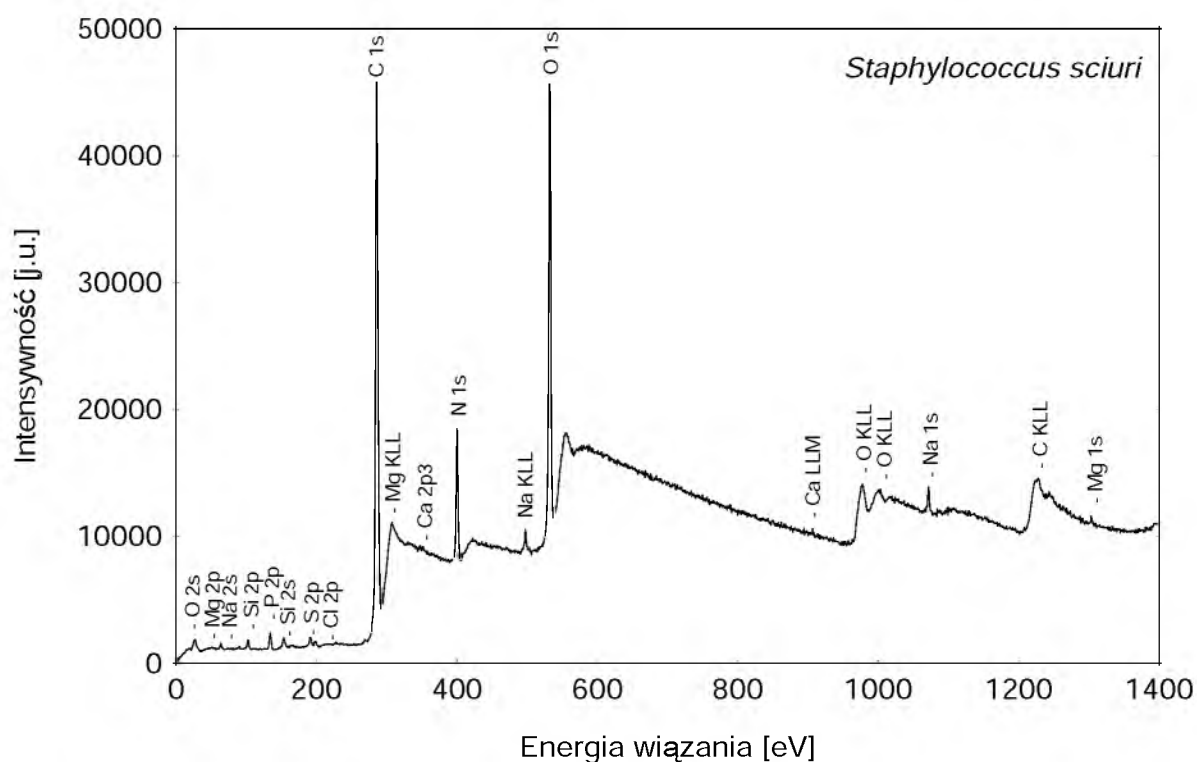
X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) gives high information content and yields quantitative data on elemental composition and chemical bonding of the surface layer of the bacteria. Based on the registered inspection XPS spectra, in the energy 0 - 1400 eV, average atom concentration elements on the surface of the tested microorganisms was determined. The calculations were performed using the Physical Electronics *Multipak* which includes only those elements for which the characteristic lines are clearly visible in the spectrum. When interpreting the results the special attention was put on the determination of major elements (C, O, N, P) and remaining (K, Cl, Mg).

An interesting observation was made in the elemental analysis of the bacterial surfaces for two examples of XPS spectra of *Bacillus subtilis* in the temperature 37°C and 20°C. Fitted lines of carbon (C1s) and oxygen (O1s) of the bacterial samples tested for both temperatures (20°C and 37°C) using SimPeak. Analysis of this main line allowed the identification of various functional groups participating in the biomaterial of the bacterial surface. The XPS lines related to the optimal temperature are narrower and the functional groups are better distinguishable. This indicates the better quality of the cell wall surface.

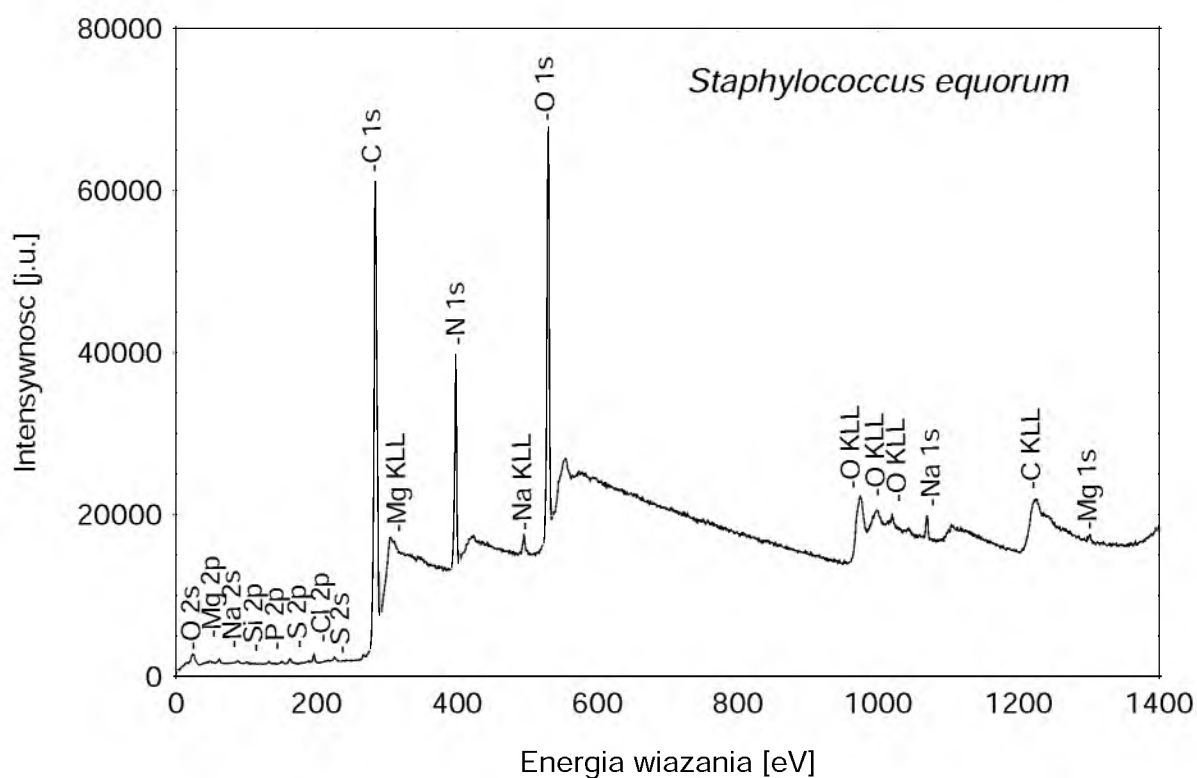
Observations of frozen the bacteria in Cryo-SEM have allowed to gain information about their surface structure, both at low and high magnifications and to determine their size. The length, thickness and smoothness of the surface of the bacteria grown in the optimal temperature are different than at a sub-optimal temperature. Also, the electronic structure is different, and the deconvolution lines C 1s and O 1s in bacteria grown at temperature 20°C revealed an additional peak. This is due to immaturity of the cell wall surface. Presence of the additional lines indicates that the temperature is one of environment of the main factors affecting the structure of the bacteria.

## 12. Zestawienie wyników pomiarów wykonanych spektrometrem fotoelektronów

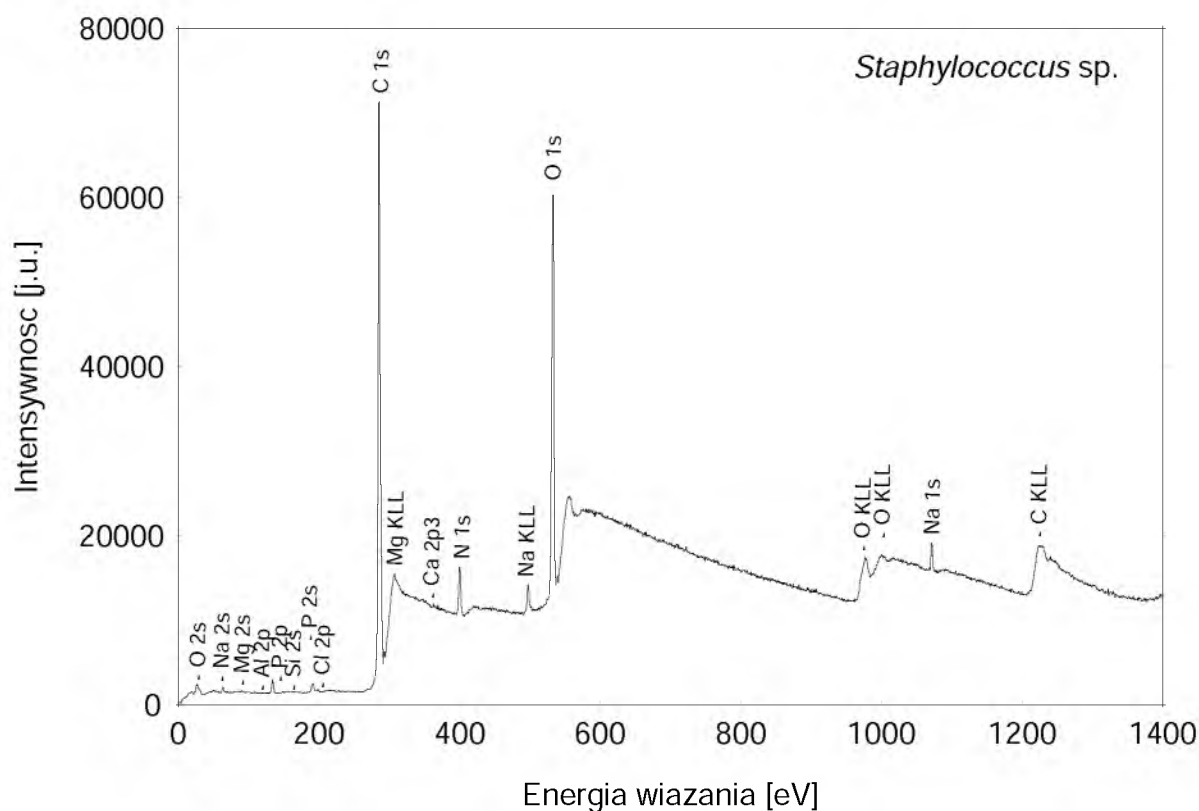
### a) *Staphylococcus sciuri*



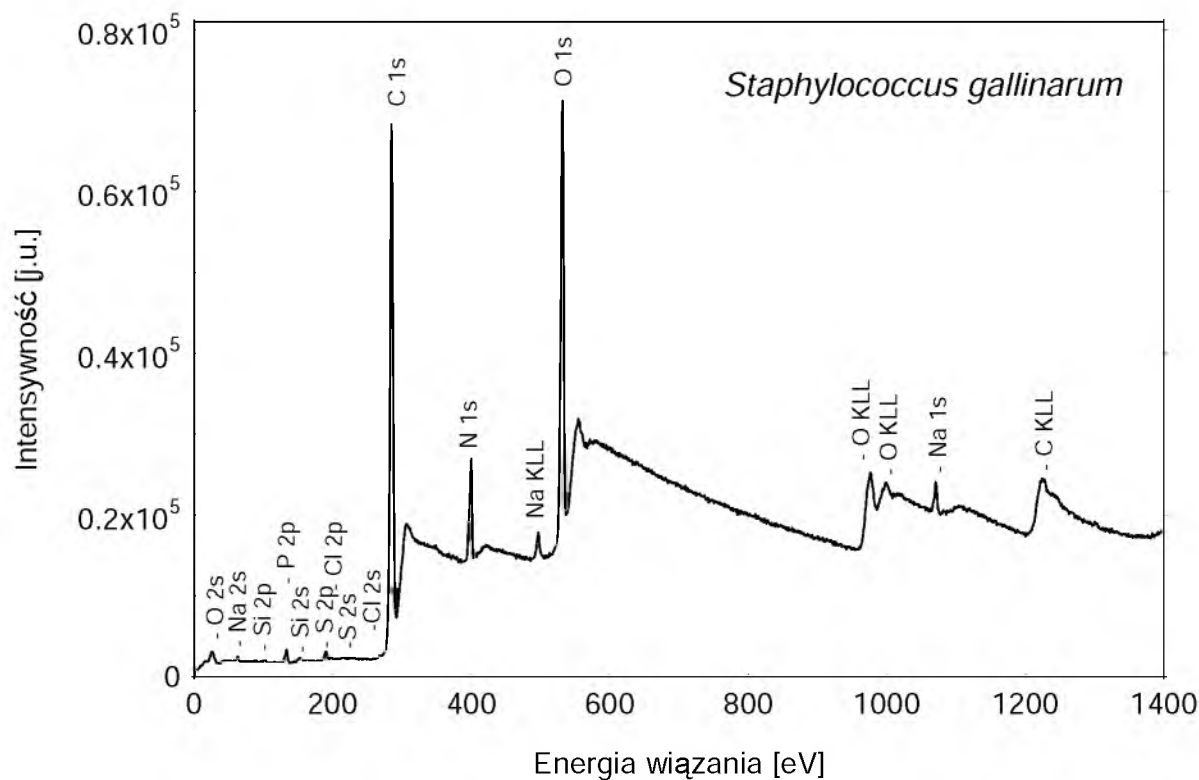
### b) *Staphylococcus equorum*

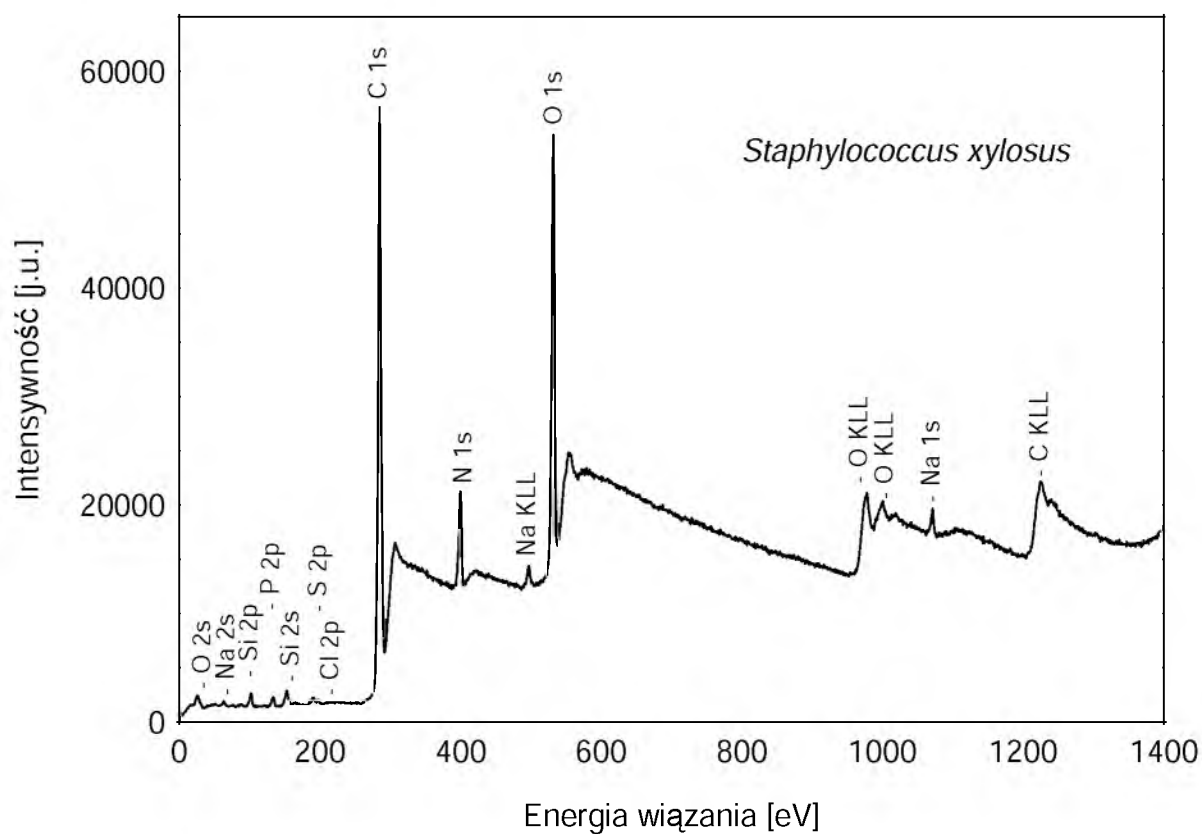
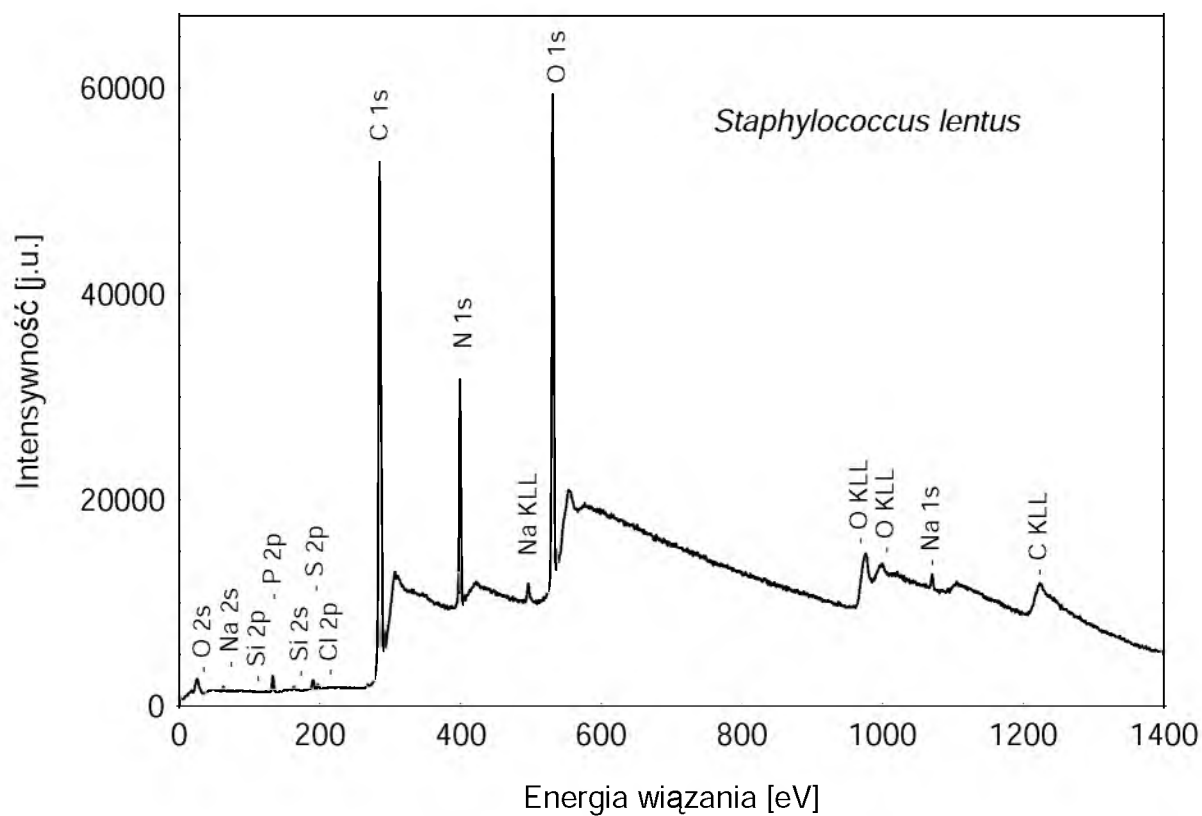


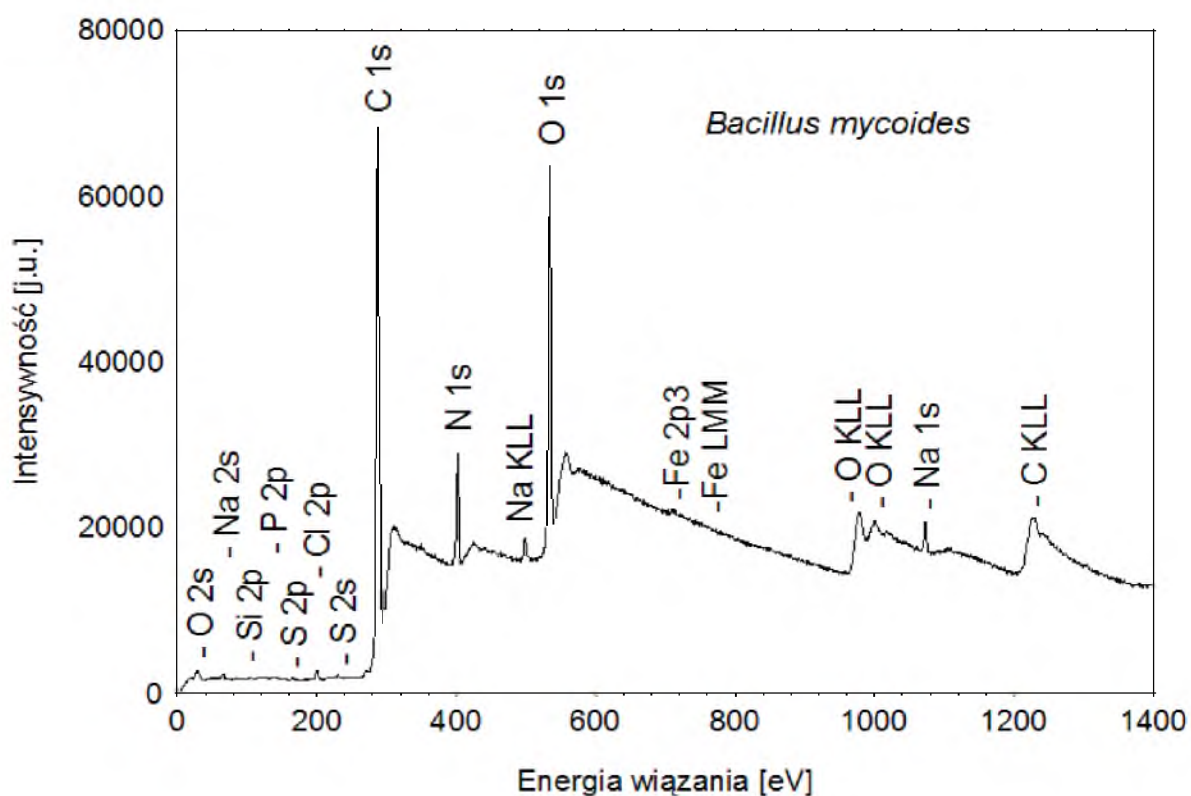
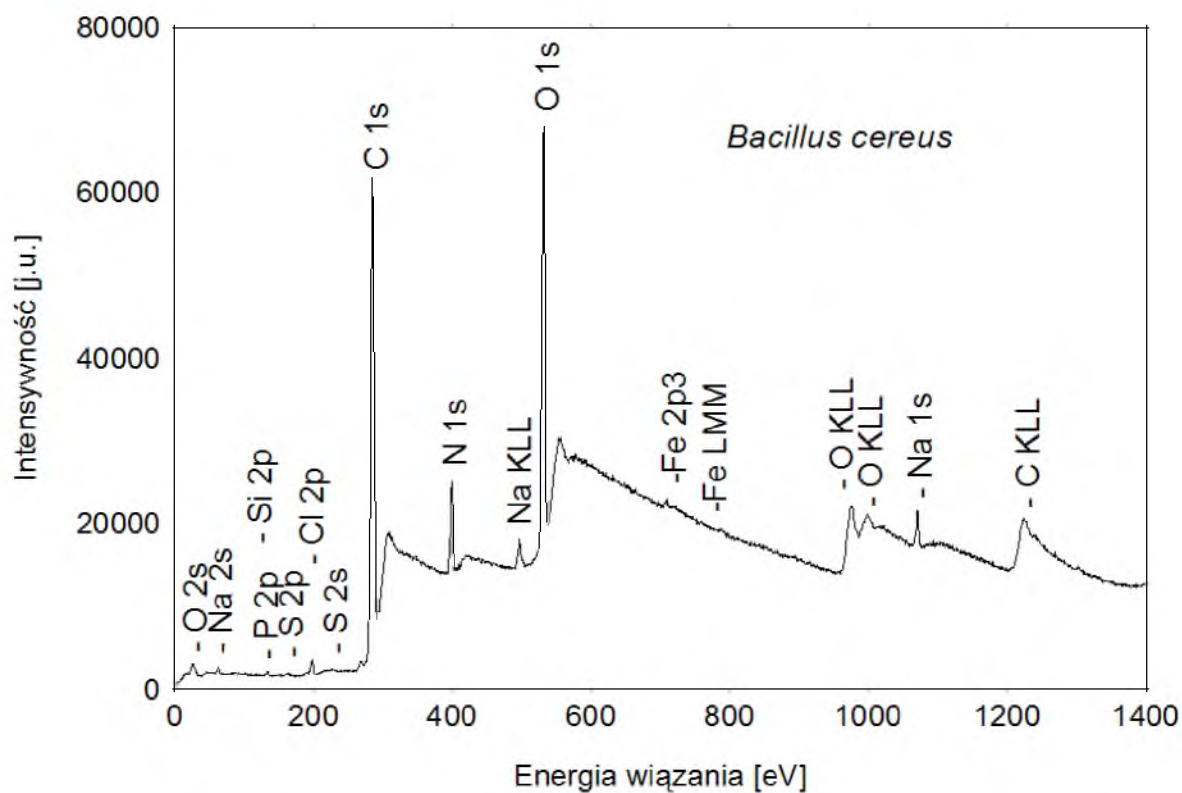


c) *Staphylococcus* sp.

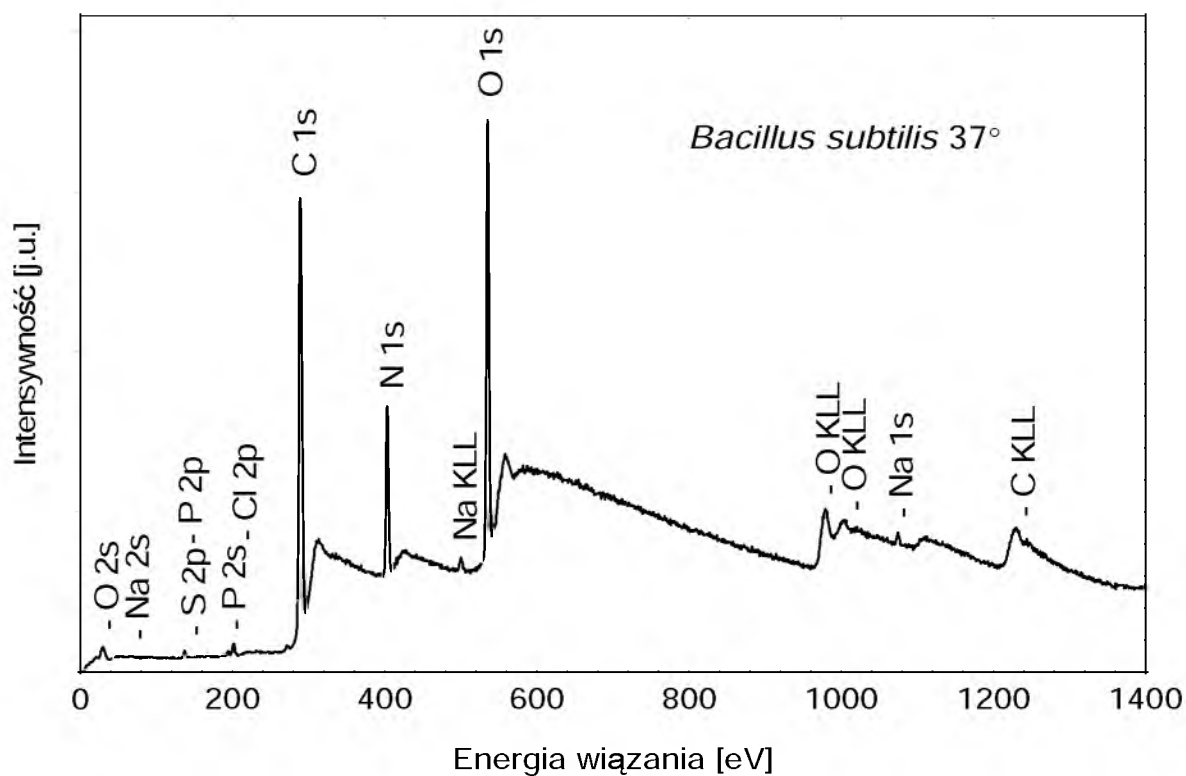
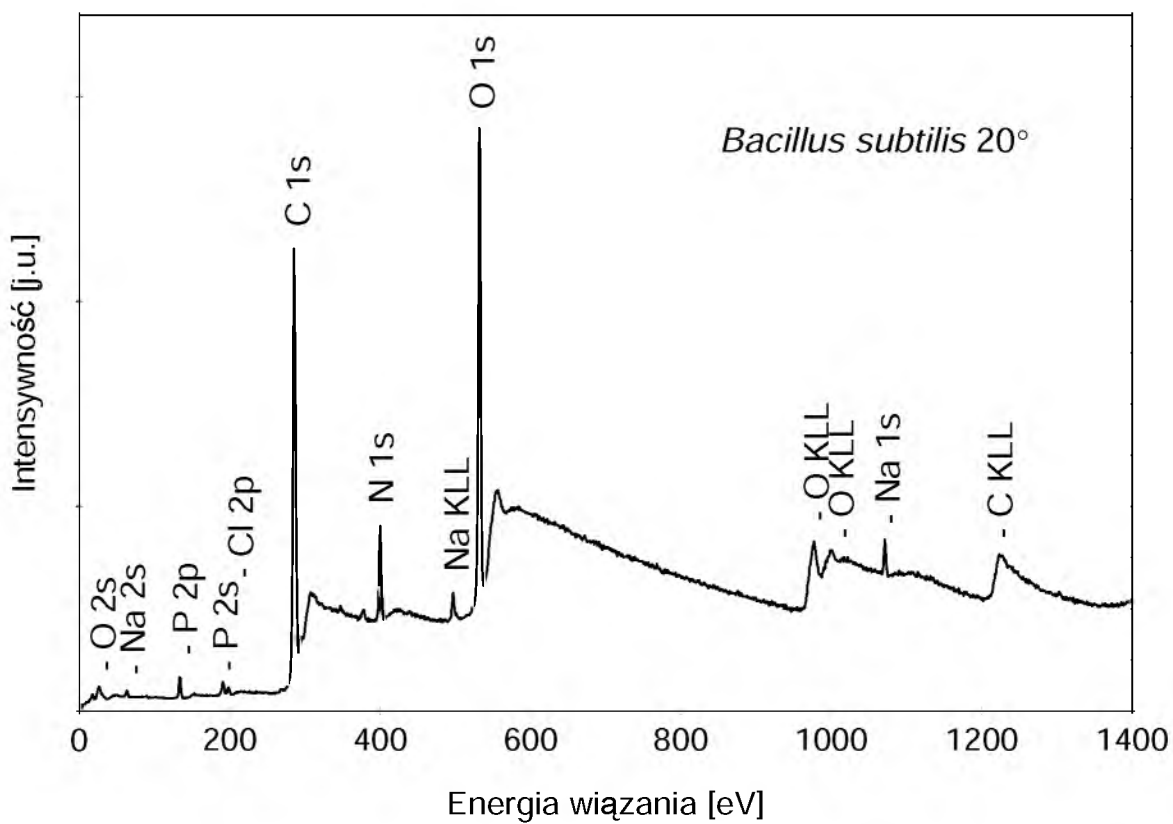
Rys. 80. Wybrane widma fotoemisyjne XPS otrzymane w szerokim zakresie energii wiązania z powierzchni bakterii pobranych w gabinetach stomatologicznych (a-c).

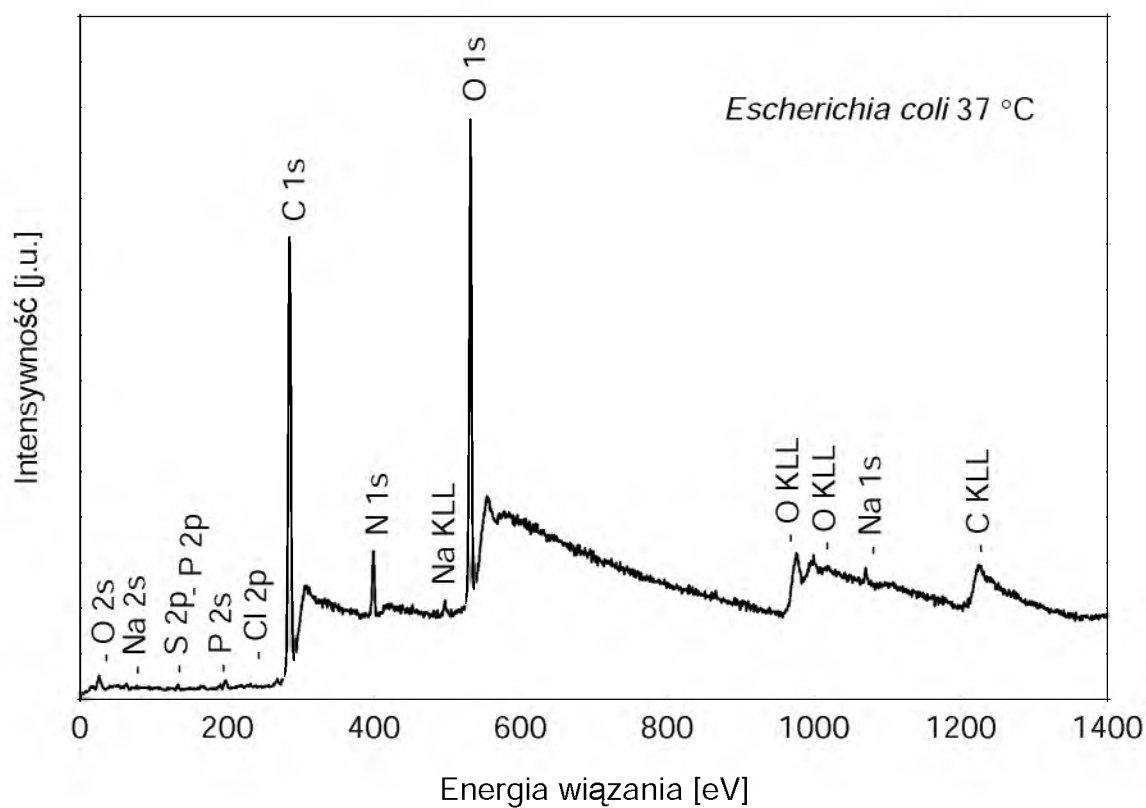
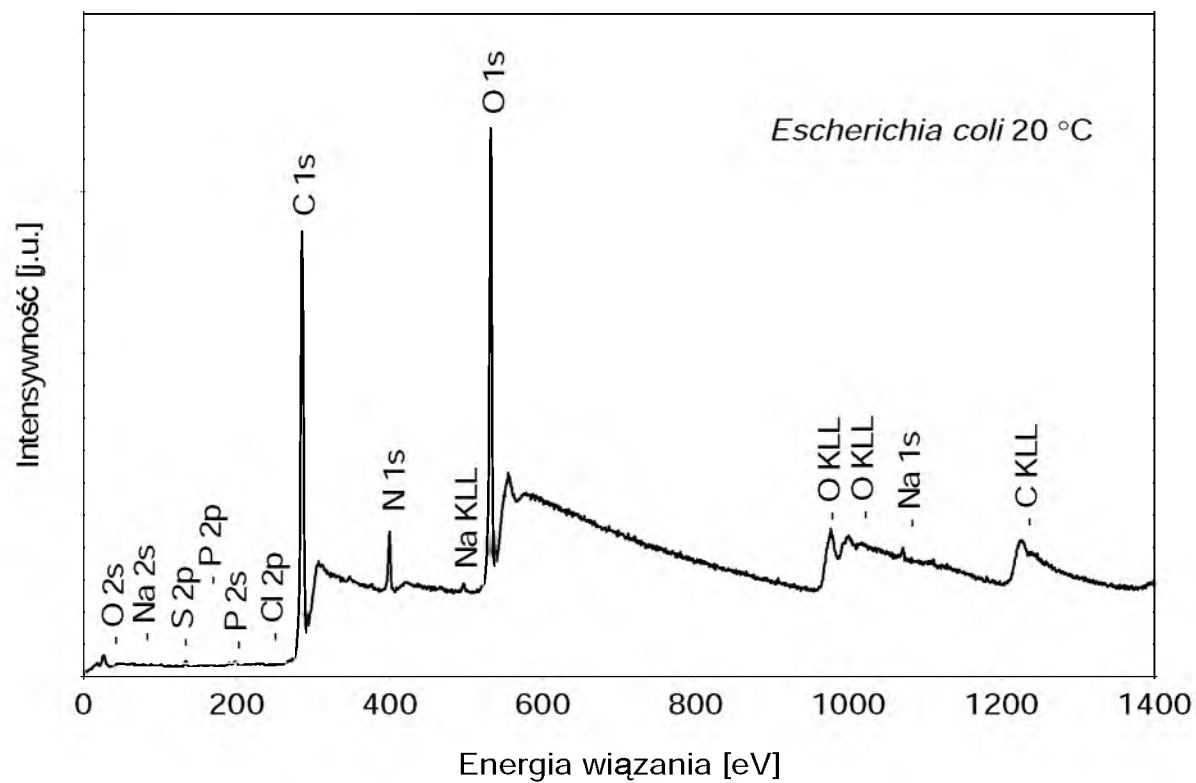
a) *Staphylococcus gallinarum*

b) *Staphylococcus xylosus*c) *Staphylococcus lentus*

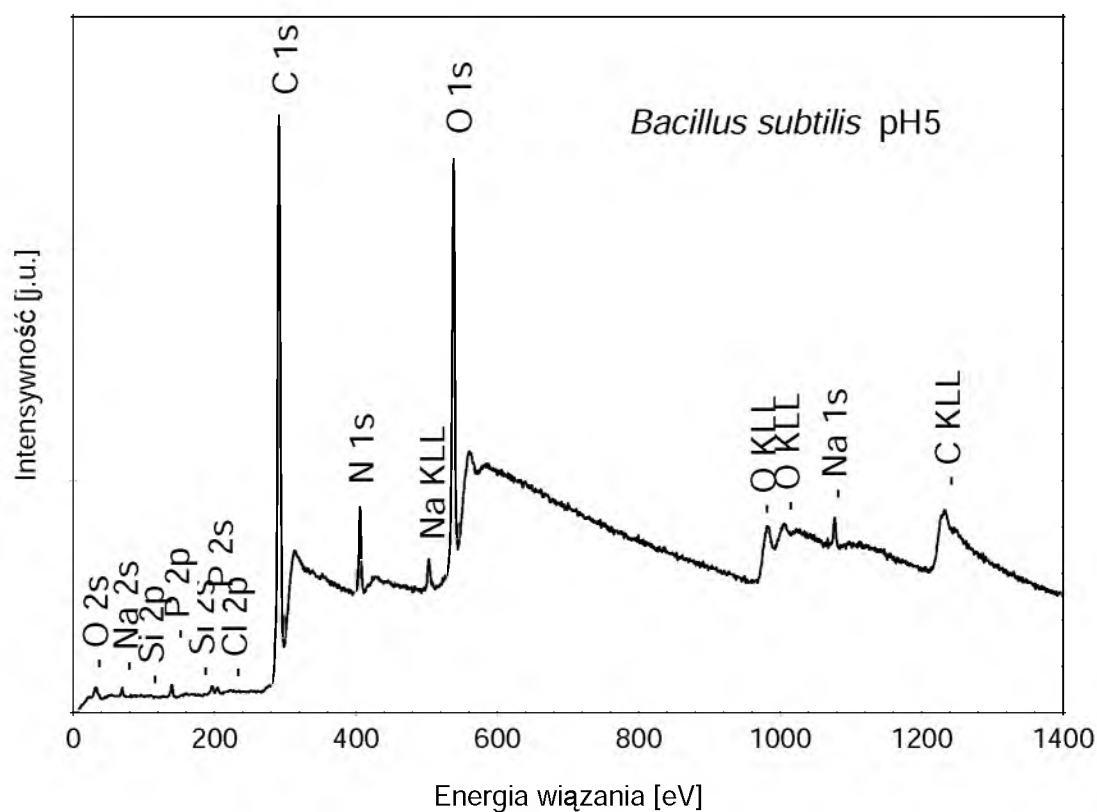
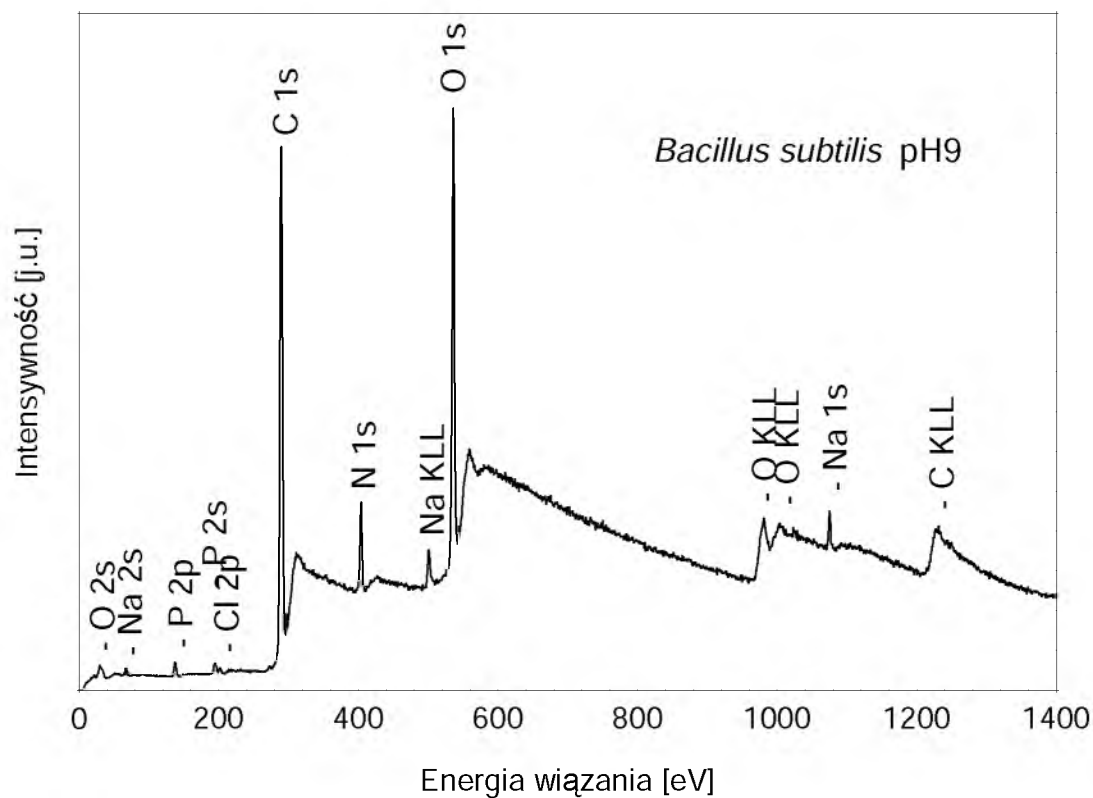
d) *Bacillus mycoides*e) *Bacillus cereus*

Rys. 81. Wybrane przeglądowe widma XPS bakterii pobranych w oczyszczalniach ścieków (a-e).

a) *Bacillus subtilis*b) *Bacillus subtilis*

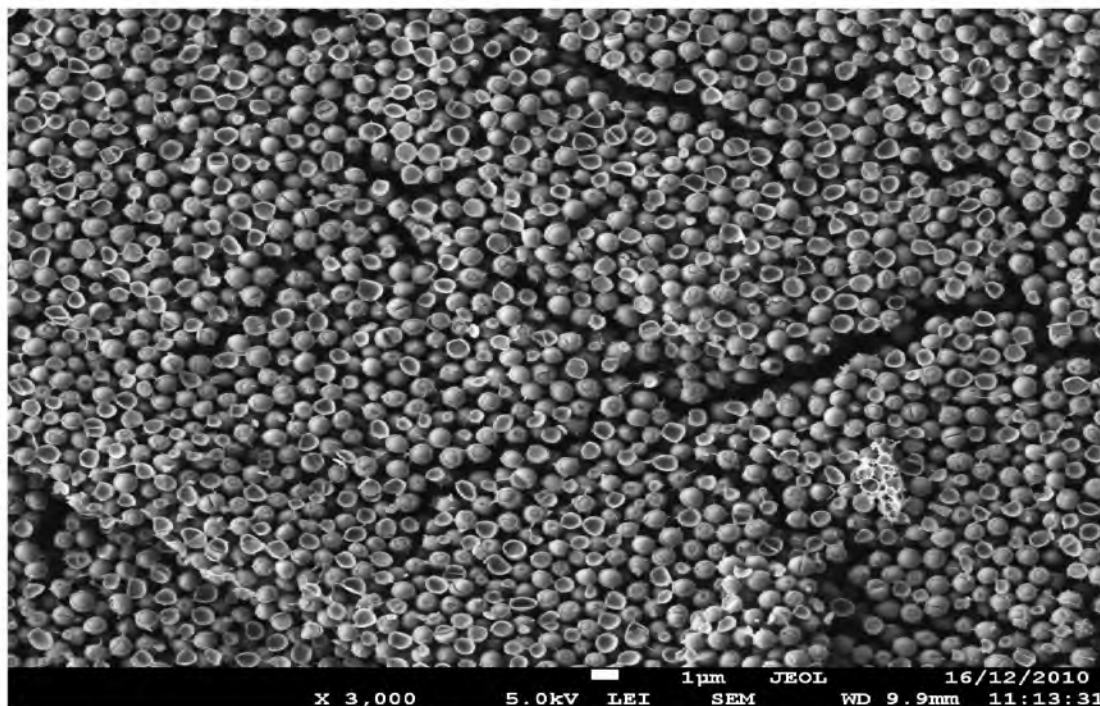
c) *Escherichia coli*d) *Escherichia coli*

Rys. 82. Wybrane widma fotoemisyjne XPS otrzymane w szerokim zakresie energii wiązania z powierzchni bakterii hodowanych w różnych temperaturach (a-d).

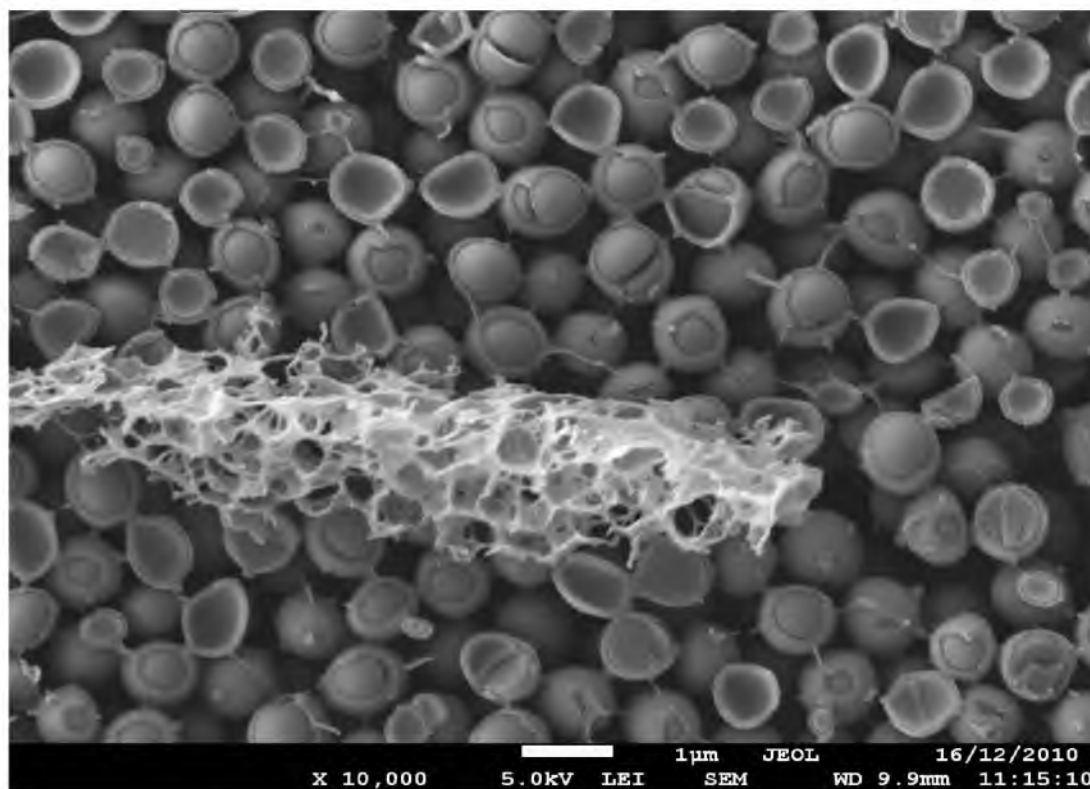
a) *Bacillus subtilis*b) *Bacillus subtilis*

Rys. 83. Wybrane widma fotoemisyjne XPS otrzymane w szerokim zakresie energii wiązania z powierzchni bakterii hodowanych w różnych odczynach pH środowiska (a-b).

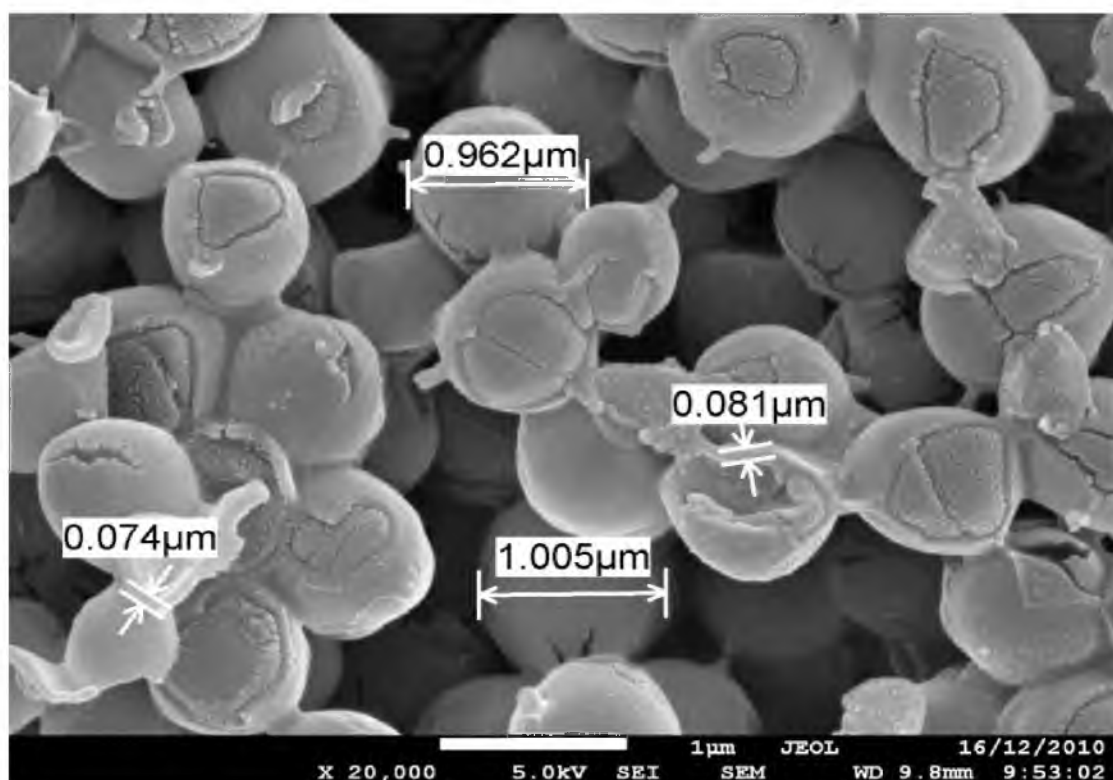
## 8. Zestawienie wybranych wyników pomiarów wykonanych skaningowym mikroskopem elektronowym



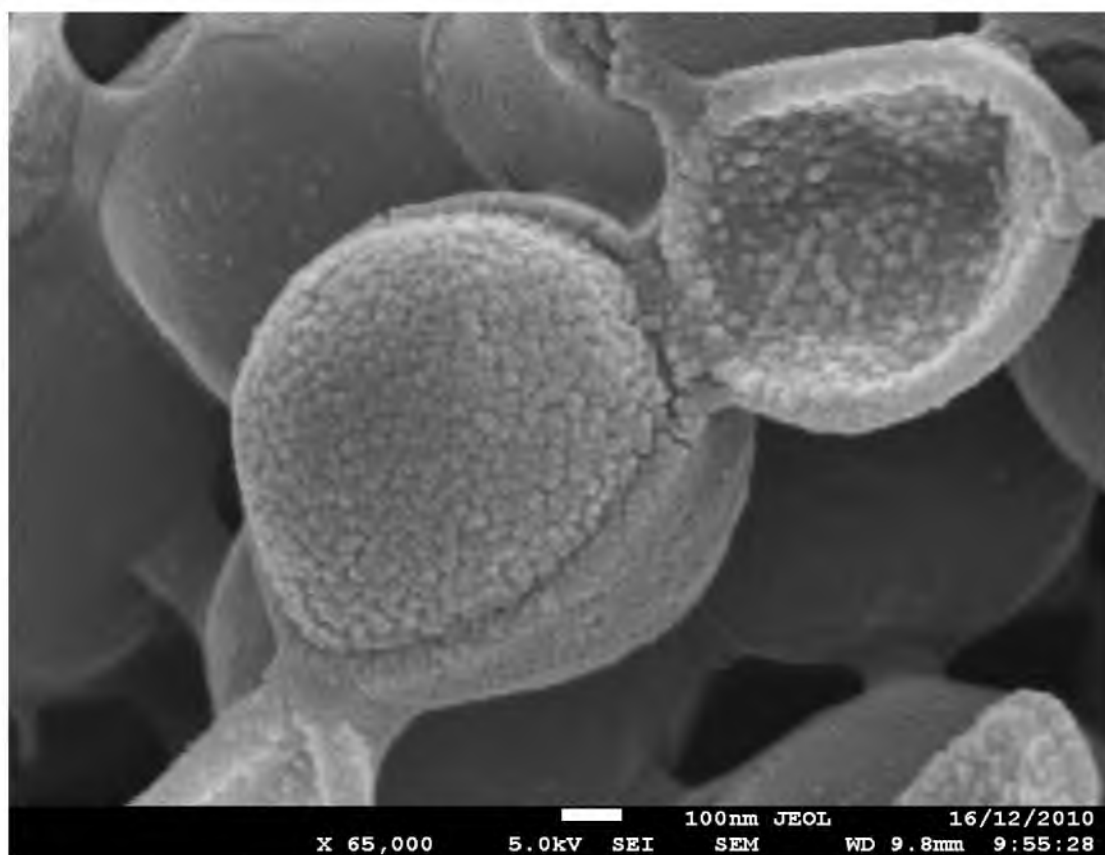
*Staphylococcus gallinarum* (fot. E. Talik).



*Staphylococcus gallinarum* (fot. E. Talik).

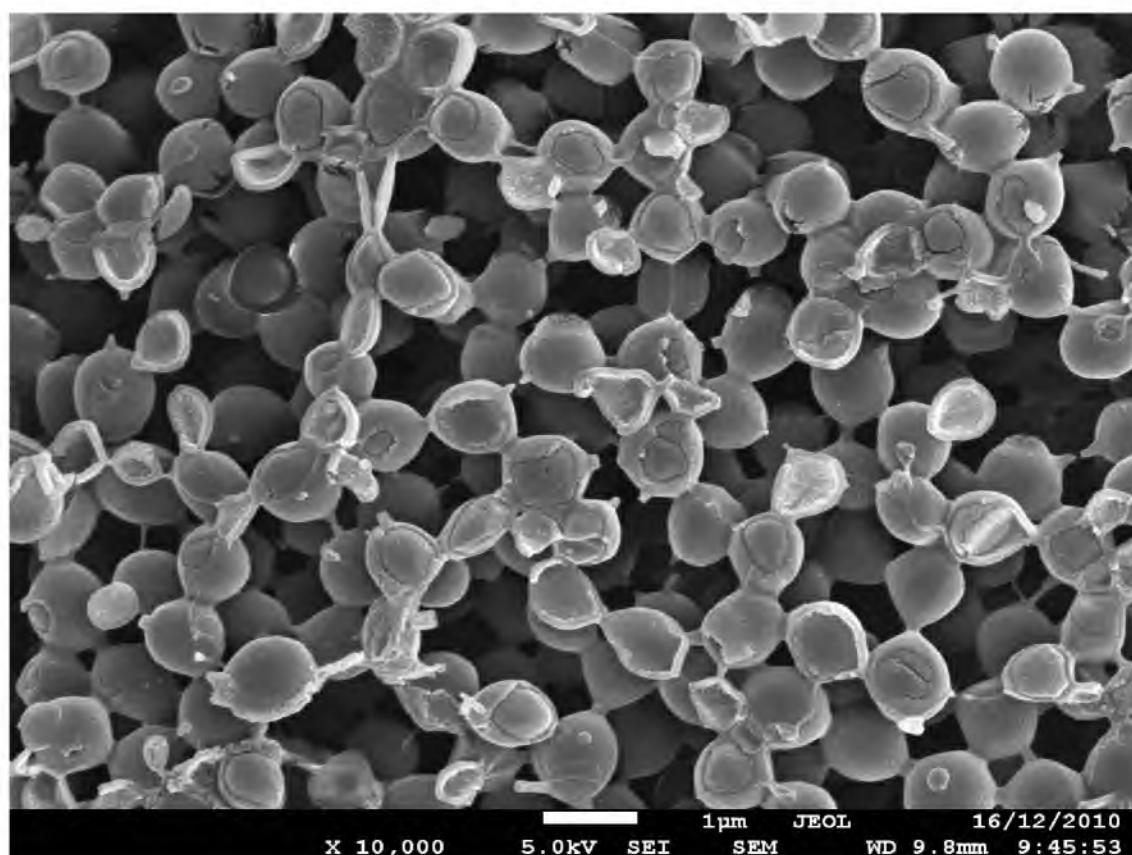


*Staphylococcus xylosus* (fot. E. Talik).

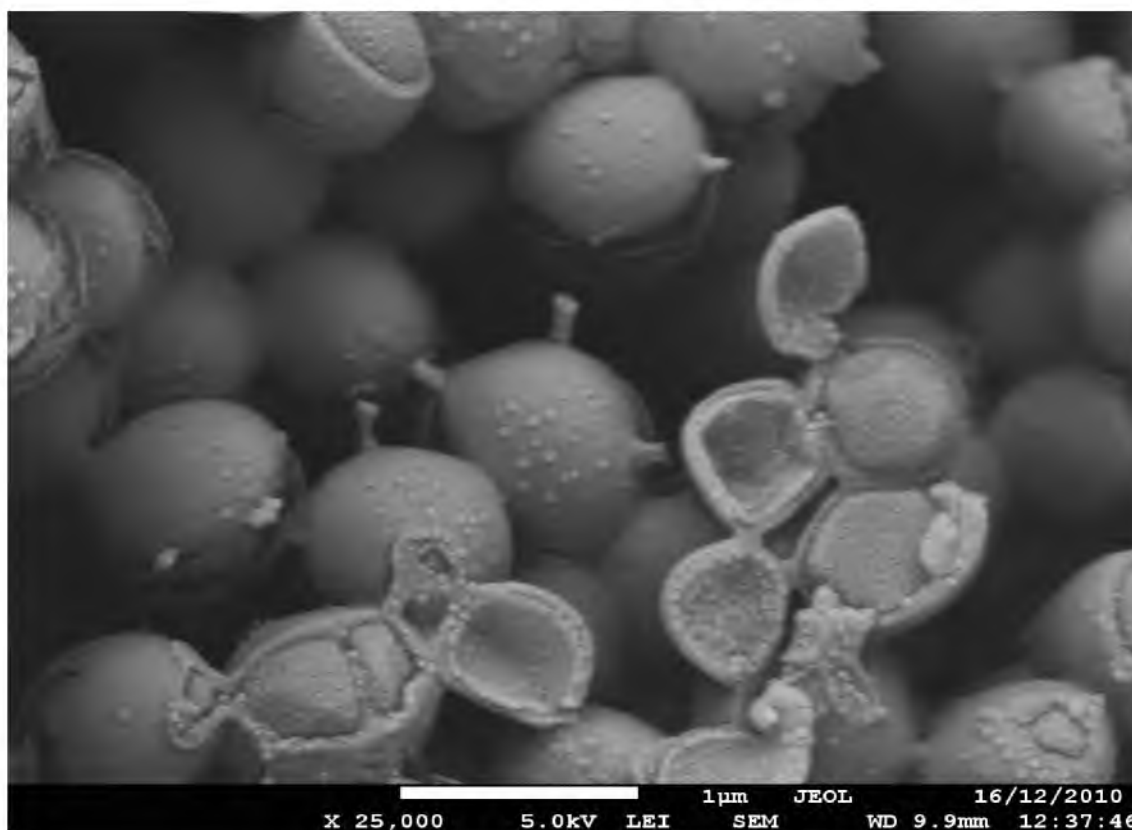


*Staphylococcus xylosus* (fot. E. Talik).

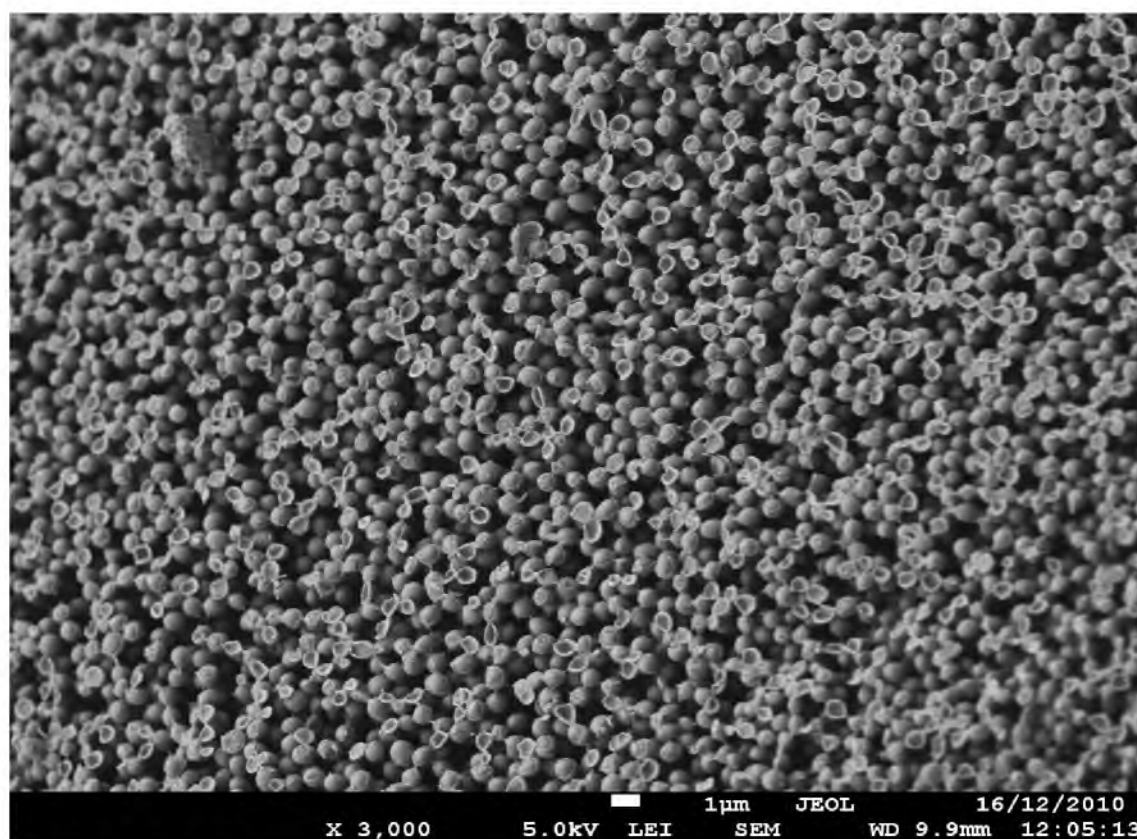




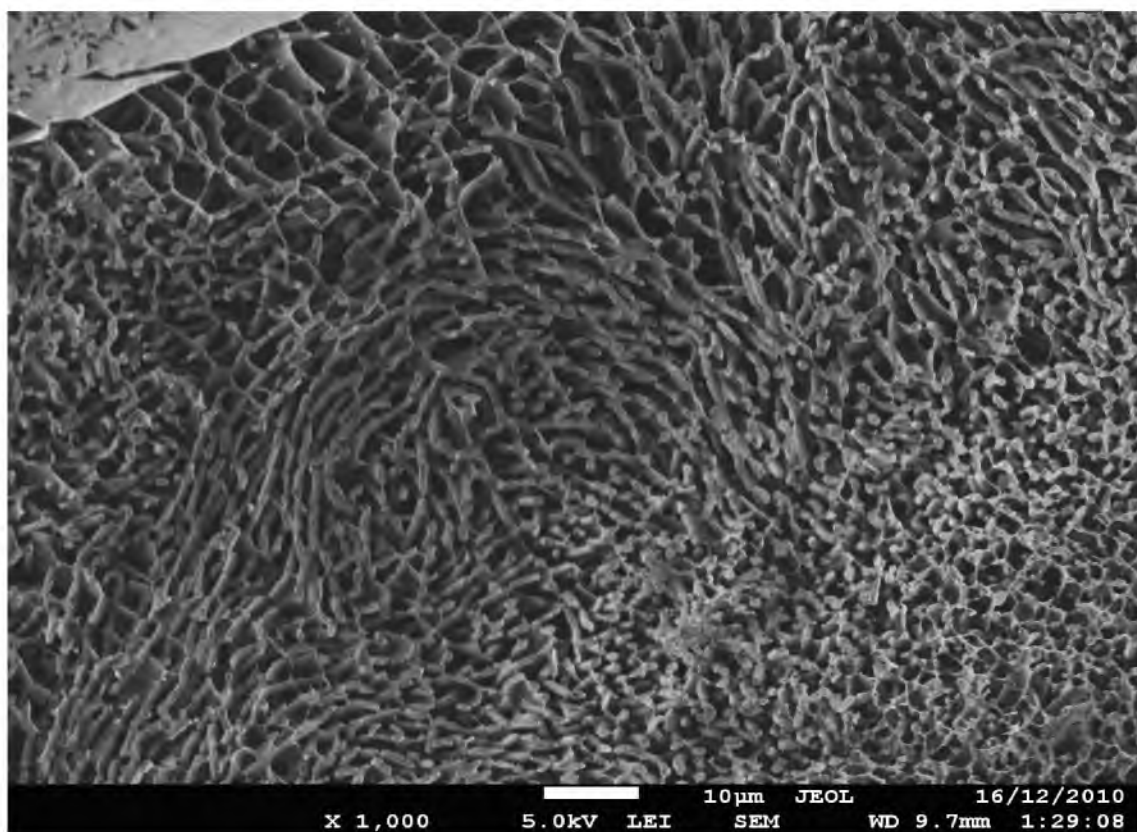
*Staphylococcus xylosus* (fot. E. Talik).



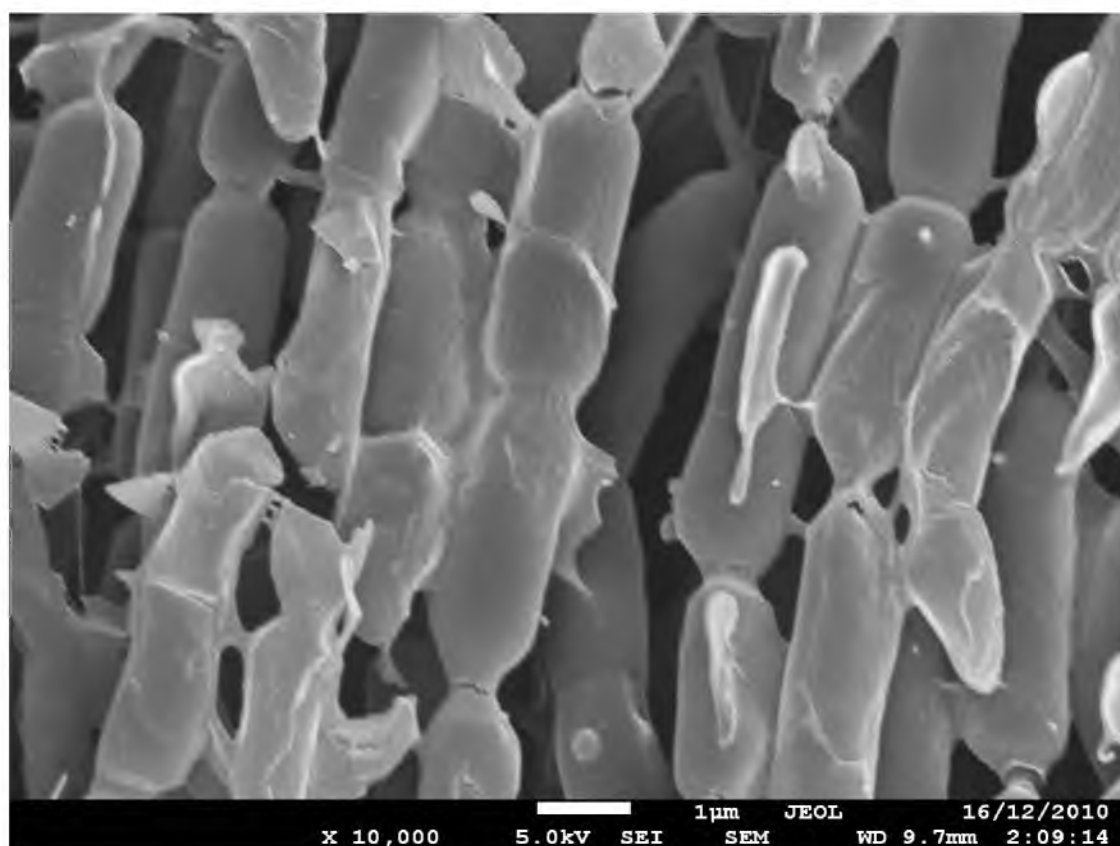
*Staphylococcus lentu* (fot. E. Talik).



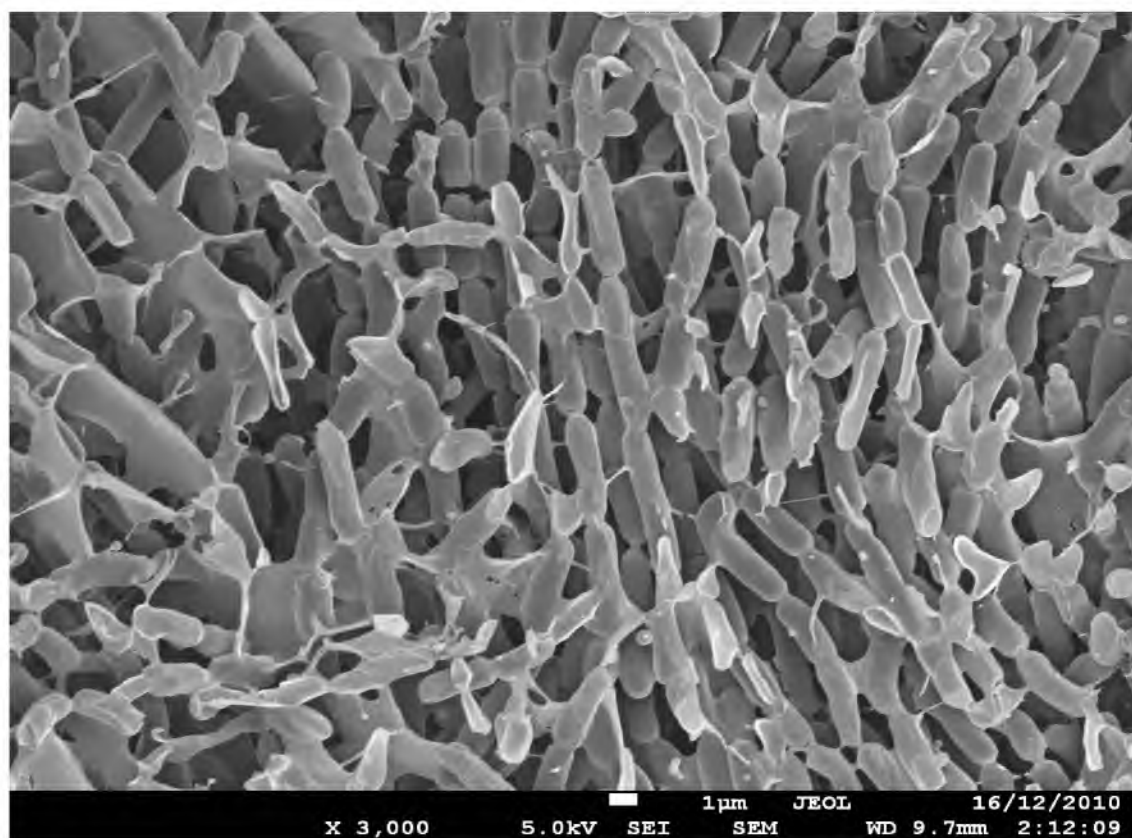
*Staphylococcus lentus* (fot. E. Talik).



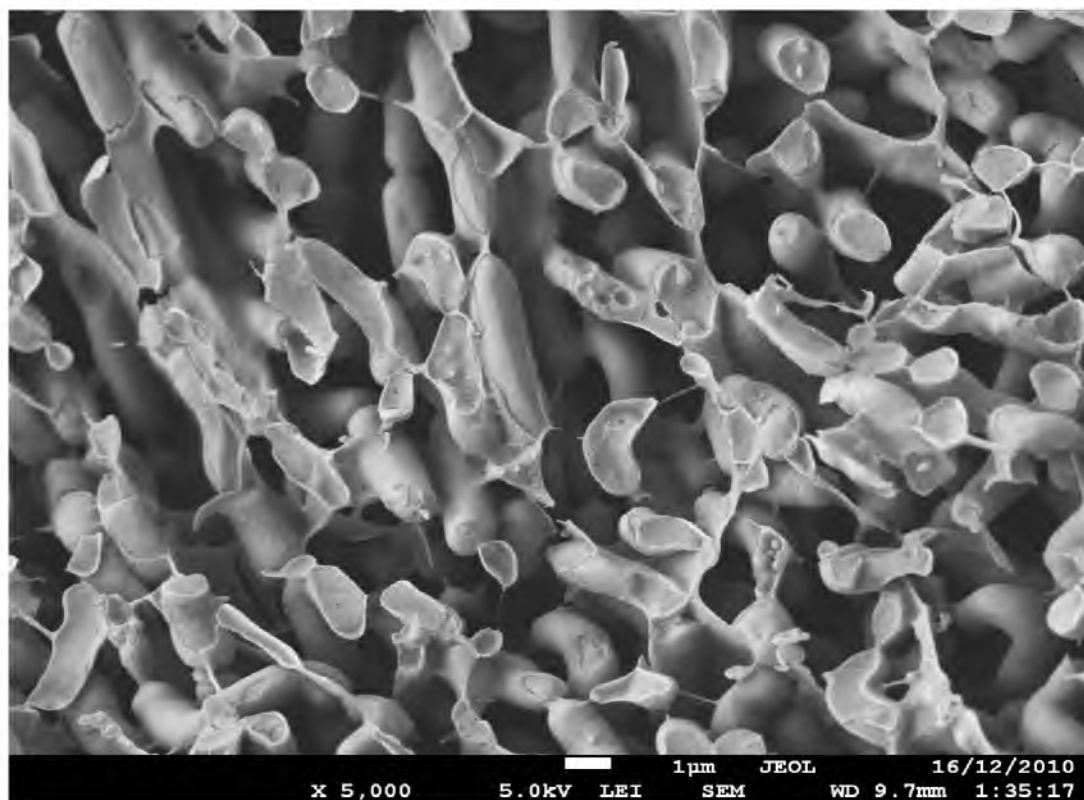
*Bacillus cereus* (fot. E. Talik).



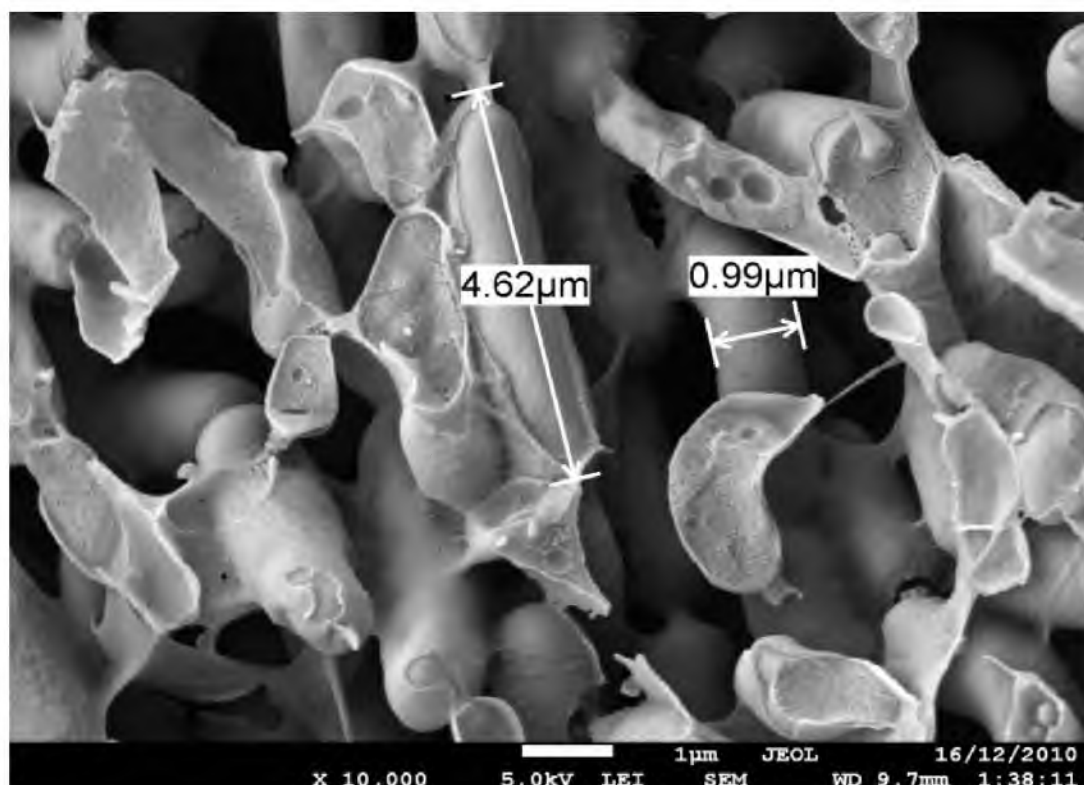
*Bacillus cereus* (fot. E. Talik).



*Bacillus cereus* (fot. E. Talik).



*Bacillus cereus* (fot. E. Talik).



*Bacillus cereus* (fot. E. Talik).

Rys. 84. Mikrofotografie wybranych gatunków bakterii z oczyszczalni ścieków.

## 13. Wykaz rysunków i tabel

### 13.1. Spis rysunków

Rys. 1. Kształt komórek bakteryjnych [5].	10
Rys. 2. a) Schematyczny wzór monomeru peptydoglikanu [5]; b) Struktura mureiny <i>E. coli</i> .	12
Rys. 3. Biosynteza mureiny [10].	13
Rys. 4. Schemat budowy ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich: 1- kwas tejchojowy, 2- białko związane z mureiną, 3- fosfolipidy, 4- kwas lipotejchojowy [3].	15
Rys. 5. Budowa kwasu tejchojowego u <i>Bacillus subtilis</i> . R – rybitol, GL – D-glukoza lub N-acetylo-D-glukozamina, Ala- reszta alaniny [2].	16
Rys. 6. Schemat budowy osłon komórkowych bakterii Gram-ujemnych [2].	18
Rys. 7. Schemat budowy ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnej [3].	19
Rys. 8. Ogólny schemat budowy lipopolisacharydu LPS [25].	20
Rys. 9. Schemat budowy lipidu A <i>E. coli</i> [37].	21
Rys. 10. Obszary energii wiązania dostępne za pomocą fotonów o różnych energiach [52].	28
Rys. 11. Schemat pomiaru metodą XPS [53].	31
Rys. 12. Schemat zjawiska fotoelektrycznego [52].	32
Rys. 13. Zmiana pracy wyjścia na skutek przyłożenia potencjału pomiędzy próbką a spektrometrem.	33
Rys. 14. Trójstopniowy model fotoemisji elektronów.	36
Rys. 15. Widma elektronów Be1s: (a) linia metalicznego Be otrzymanego przez naparowanie w próżni; (b) linia Be po wygrzaniu w powietrzu; (c) linia Be po naparowaniu w próżni i częściowym odtlenieniu cyrkonem [53].	42
Rys. 16. Schemat przejść Auger'a : (a) $KL_1L_1$ , (b) $L_1M_1M_1$ , (c) $L_3VV$ , (d) przejście Costera – Kroninga $L_1L_2M_1$ [62].	44
Rys. 17. Analiza linii Cu2p dla metalicznego Cu z uwzględnieniem tła [58].	46
Rys. 18. Różne metody odejmowania tła dla linii Ni2p [58].	47
Rys. 19. Przykładowy pik i jego główne cechy [64].	48
Rys. 20. Wkład poszczególnych rejonów próbki położonych na różnych głębokościach do całkowitego natężenia emitowanych fotoelektronów dla kąta padającego kwantu $45^\circ$ .	50
Rys. 21. Schemat blokowy urządzenia stosowanego do badań w spektroskopii fotoelektronów [53, zmodyfikowano].	51
Rys. 22. Układ detektora fotoelektronów spektrometru PHI5700/660 (zmodyfikowano) [55].	52
Rys. 23. Schemat budowy elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) [71].	60
Rys. 24. Schemat budowy działu elektronowego.	62
Rys. 25. Schemat soczewki elektromagnetycznej.	63
Rys. 26. Schemat detektora Everharta-Thornleya [75].	64
Rys. 27. Efekty oddziaływania wiązki elektronów z materią [69].	66
Rys. 28. Schemat wielkości obszarów, z których pochodzą różne rodzaje sygnałów emitowane przez próbkę podczas bombardowania przez wiązkę elektronów (zmodyfikowano) [69].	67
Rys. 29. Schemat zależności wielkości i kształtu obszaru wzbudzenia od liczby atomowej badanego materiału i napięcia przyspieszającego wiązkę elektronów.	69

Rys. 30. Ścinanie próbki przy pomocy chłodzonego ostrza (fot. J. Płoszaj-Pyrek).....	71
Rys. 31. Proces napyłania próbek platyną (fot. J. Płoszaj-Pyrek).....	72
Rys. 32. Skaningowy Mikroskop Elektronowy JEOL JSM-7600F (FE-SEM) z przystawką do badań środowiskowych Cryo-SEM (fot. J. Płoszaj-Pyrek). ....	73
Rys. 33. Graficzny interfejs użytkownika (GUI) do obserwacji i nawigacji (fot. J. Płoszaj-Pyrek).....	75
Rys. 34. Stanowisko do wstępnego zamrażania próbek Cryo-SEM oraz transfer (fot. J. Płoszaj-Pyrek, schemat Quorum Technologies). ....	77
Rys. 35. Urządzenie do przenoszenia próbek Cryo-SEM (fot. Quorum Technologies). ....	78
Rys. 36. Elementy komory preparacyjnej Cryo-SEM (fot. J. Płoszaj-Pyrek).....	78
Rys. 37. Impaktor airIDEAL®3P firmy bioMerieux do poboru próbek (fot. J. Płoszaj-Pyrek).....	80
Rys. 38. Fotografia przykładowego stanowiska pomiarowego (fot. J. Wolany). ....	81
Rys. 39. Widok ogólny i schemat budowy impaktora Andersena [89].....	82
Rys. 40. Uchwyt pomiarowy z próbkami bakterii na płatkach węglowych (fot. J. Płoszaj-Pyrek). ....	85
Rys. 41. Różne typy podstawek próbki (fot. Quorum Technologies).....	86
Rys. 42. Uchwyt z próbkami na podstawce (fot. J. Płoszaj-Pyrek). ....	86
Rys. 43. Zestawienie pasm walencyjnych (VB) dla bakterii: a) <i>Staphylococcus sciuri</i> , b) <i>Staphylococcus equorum</i> , c) <i>Staphylococcus</i> sp.....	91
Rys. 44. Zestawienie dopasowania linii tlenu O1s dla bakterii Gram-dodatnich <i>Staphylococcus</i> .....	93
Rys. 45. Zestawienie dopasowania linii O1s dla bakterii Gram-dodatnich <i>Staphylococcus</i> .....	95
Rys. 46. Zestawienie dopasowania linii azotu N1s dla bakterii Gram-dodatnich z rodzaju <i>Staphylococcus</i> .....	96
Rys. 47. Bakterie <i>Staphylococcus sciuri</i> widoczne pod mikroskopem elektronowym SEM (fot. E. Talik).....	99
Rys. 48. Bakterie <i>S. equorum</i> widoczne pod mikroskopem elektronowym SEM (fot. E. Talik).....	99
Rys. 49. Bakterie <i>Staphylococcus</i> sp. widoczne pod mikroskopem elektronowym SEM (fot. E. Talik).....	100
Rys. 50. Dopasowanie linii C1s u bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> pochodzących z oczyszczalni ścieków....	106
Rys. 51. Dopasowanie linii O1s u bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> pochodzących z oczyszczalni ścieków....	107
Rys. 52. Dopasowanie linii N1s u bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> pochodzących z oczyszczalni ścieków....	108
Rys. 53. Dopasowanie linii C1s u bakterii z rodzaju <i>Bacillus</i> pochodzących z oczyszczalni ścieków. ....	110
Rys. 54. Dopasowanie linii O1s u bakterii z rodzaju <i>Bacillus</i> pochodzących z oczyszczalni ścieków. ....	111
Rys. 55. Dopasowanie linii N1s u bakterii z rodzaju <i>Bacillus</i> pochodzących z oczyszczalni ścieków. ....	112
Rys. 56. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>S. gallinarum</i> (fot. E. Talik).....	113
Rys. 57. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>S. xylosus</i> (fot. E. Talik).....	114
Rys. 58. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>Staphylococcus lentus</i> (fot. E. Talik). ....	115
Rys. 59. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>Bacillus cereus</i> (fot. E. Talik).....	116
Rys. 60. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>B. cereus</i> (fot. E. Talik). ....	117
Rys. 61. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>B. cereus</i> (fot. E. Talik). ....	118
Rys. 62. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>B. mycoides</i> (fot. E. Talik).....	119
Rys. 63. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>B. mycoides</i> (fot. E. Talik).....	119
Rys. 64. Zestawienie dopasowania linii węgla C1s próbek <i>B. subtilis</i> hodowanych w temp. 37 i 20°C.....	122
Rys. 65. Zestawienie dopasowania linii O1s próbek <i>Bacillus subtilis</i> hodowanych w temp. 37 i 20°C.....	124
Rys. 66. Zestawienie dopasowania linii N1s próbek <i>B. subtilis</i> hodowanych w temp. 37 i 20°C. ....	126



Rys. 67. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>B. subtilis</i> : a) 37°C, b) 20°C (powiększenie 25 000x) (fot. E. Talik).....	129
Rys. 68. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>B. subtilis</i> hodowanych przez 48 godzin w temperaturze 37°C (powiększenie x 10 000; fot. E. Talik).....	130
Rys. 69. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>B. subtilis</i> hodowanych przez 48 godzin w temperaturze 20°C (powiększenie x 10 000; fot. E. Talik).....	130
Rys. 70. Zestawienie dopasowania linii C1s u bakterii <i>E. coli</i> hodowanych w temp. 37 i 20°C.....	133
Rys. 71. Zestawienie dopasowania linii O1s u bakterii <i>E. coli</i> hodowanych w temp. 37 i 20°C.....	135
Rys. 72. Zestawienie dopasowania linii N1s u bakterii <i>Escherichia coli</i> hodowanych w temp. 37 i 20°C.....	137
Rys. 73. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>E. coli</i> hodowanych w 37°C (powiększenie 5 000x) (fot. E. Talik).....	139
Rys. 74. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>E. coli</i> hodowanych w 20°C (powiększenie 5 000x) (fot. E. Talik).....	139
Rys. 75. Widma XPS linii C1s dla <i>B. subtilis</i> hodowanych w kwasowym i zasadowym odczynie środowiska.	142
Rys. 76. Widma XPS linii O1s dla <i>B. subtilis</i> hodowanych w kwasowym i zasadowym odczynie środowiska.	144
Rys. 77. Widma XPS linii N1s dla <i>B. subtilis</i> hodowanych w kwasowym i zasadowym odczynie środowiska.	145
Rys. 78. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>B. subtilis</i> rosnących na podłożu o pH równym 9 (powiększenia 10 i 20 tys. razy; fot. E. Talik).....	148
Rys. 79. Obraz otrzymany z mikroskopu elektronowego bakterii <i>B. subtilis</i> rosnących na podłożu o pH równym 5 (powiększenia 10 i 20 tys. razy; fot. E. Talik).....	149
Rys. 80. Wybrane widma fotoemisyjne XPS otrzymane w szerokim zakresie energii wiązania z powierzchni bakterii pobranych w gabinetach stomatologicznych (a-c).....	176
Rys. 81. Wybrane przeglądowe widma XPS bakterii pobranych w oczyszczalniach ścieków (a-e).....	178
Rys. 82. Wybrane widma fotoemisyjne XPS otrzymane w szerokim zakresie energii wiązania z powierzchni bakterii hodowanych w różnych temperaturach (a-d).....	180
Rys. 83. Wybrane widma fotoemisyjne XPS otrzymane w szerokim zakresie energii wiązania z powierzchni bakterii hodowanych w różnych odczynach pH środowiska (a-b).....	181
Rys. 84. Mikrofotografie wybranych gatunków bakterii z oczyszczalni ścieków.....	187

## 13.2. Spis tabel

Tabela 1. Porównanie spektroskopii UPS i XPS. ....	29
Tabela 2. Parametry techniczne mikroskopu JEOL JSM-7600F (FE-SEM) [78].....	74
Tabela 3. Koncentracja atomowa pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowych struktur bakterii <i>S. sciuri</i> , <i>S. equorum</i> i <i>Staphylococcus</i> sp. określona metodą XPS. Podane stężenia atomowe (w %) są wartościami średnimi. ....	88
Tabela 4. Proporcje koncentracji atomowych wybranych pierwiastków wchodzących w skład badanego materiału. ....	89
Tabela 5. Wyniki występowania C1s, O1s i N1s w różnych połączeniach chemicznych oraz ich intensywności dla badanych próbek. ....	97
Tabela 6. Koncentracja atomowa pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowych struktur bakterii <i>S. gallinarum</i> , <i>S. xylosus</i> i <i>S. lentus</i> określona metodą XPS. ....	102
Tabela 7. Koncentracja atomowa pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowych struktur bakterii <i>B. mycoides</i> i <i>B. cereus</i> określona metodą XPS. ....	103
Tabela 8. Stosunek koncentracji O/C, N/C i P/C dla bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> .....	103

Tabela 9. Stosunek koncentracji O/C, N/C i P/C dla bakterii z rodzaju <i>Bacillus</i> . ....	103
Tabela 10. Wyniki występowania C1s, O1s i N1s w różnych połączeniach chemicznych oraz ich intensywności dla badanych bakterii. ....	105
Tabela 11. Wyniki występowania C1s, O1s i N1s w różnych połączeniach chemicznych oraz ich intensywności dla badanych bakterii. ....	109
Tabela 12. Koncentracja atomowa pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowych struktur bakterii <i>B. subtilis</i> hodowanych w różnych temperaturach, określona metodą XPS. ....	121
Tabela 13. Udział poszczególnych typów wiązań w całkowitej procentowej zawartości wykrytego węgla w bakteriach <i>B. subtilis</i> hodowanych w temp. 37 i 20°C. ....	123
Tabela 14. Udział poszczególnych typów wiązań w całkowitej procentowej zawartości wykrytego tlenu w próbkach <i>B. subtilis</i> hodowanych w temp. 37 i 20°C. ....	125
Tabela 15. Zestawienie wyników analizy XPS bakterii z rodzaju <i>Bacillus</i> hodowanych w temp. 37 i 20°C. ....	127
Tabela 16. Koncentracja atomowa pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowych struktur bakterii <i>E. coli</i> hodowanych w temp. 37 i 20°C określona metodą XPS. ....	131
Tabela 17. Wyniki występowania C1s, O1s i N1s w różnych połączeniach chemicznych oraz ich intensywności dla badanych próbek <i>E. coli</i> hodowanych w odmiennych temperaturach. ....	132
Tabela 18. Udział poszczególnych typów wiązań w związkach do całkowitej zawartości wykrytego węgla w próbkach <i>E. coli</i> hodowanych w temp. 37 i 20°C. ....	134
Tabela 19. Zawartość poszczególnych typów wiązań w związkach do całkowitej procentowej zawartości wykrytego tlenu w próbkach <i>E. coli</i> hodowanych w temp. 37 i 20°C. ....	136
Tabela 20. Stosunek koncentracji atomowej pierwiastków na powierzchni bakterii <i>B. subtilis</i> i <i>E. coli</i> hodowanych w różnych warunkach temperaturowych (37°C i 20°C). ....	138
Tabela 21. Koncentracja atomowa pierwiastków wchodzących w skład powierzchniowych struktur bakterii <i>B. subtilis</i> hodowanych w kwaśnym i zasadowym środowisku. ....	140
Tabela 22. Wyniki występowania C1s, O1s i N1s w różnych połączeniach chemicznych oraz ich intensywności dla badanych bakterii <i>B. subtilis</i> hodowanych w różnym środowisku pH. ....	141
Tabela 23. Stosunek koncentracji atomowej pierwiastków na powierzchni bakterii <i>B. subtilis</i> hodowanych na podłożach o zróżnicowanym odczynie (pH 5 i 9). ....	146
Tabela 24. Udział poszczególnych typów wiązań w związkach do całkowitej procentowej zawartości wykrytego węgla na podłożach o zróżnicowanym pH (5 i 9). ....	147
Tabela 25. Zawartość poszczególnych typów wiązań w związkach do całkowitej procentowej zawartości wykrytego tlenu na podłożach o zróżnicowanym pH (5 i 9). ....	147



## 14. Piśmiennictwo

- [1] Bardowski J. (2007), *Mikrobiologia techniczna*, (red.) Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [2] Kunicki-Goldfinger W. J. H. (2008), *Życie bakterii*, (red.) Baj J., Markiewicz Z.. Wyd. nowe, (7 zm. - 4 dodr.), Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [3] Baj J., Markiewicz Z. (2006), *Biologia molekularna bakterii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [4] Schlegel H. G. (2008), *Mikrobiologia ogólna*, (red.) Markiewicz Z., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [5] Schlegel H. G. (2001), *Mikrobiologia ogólna*, (red.) Markiewicz Z., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [6] Nicklin J., Graeme-Cook K., Killington R. (2011), *Mikrobiologia*, (red.) Markiewicz Z., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [7] Singleton P. (2000), *Bakterie w biologii, biotechnologii i medycynie*, (red.) Markiewicz Z., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [8] Mysza K., Biała W., Czaczyk K. (2005), *Kinetyka tworzenia biofilmów bakteryjnych na materiałach w zależności od dostępności składników pokarmowych*, Żywność, Nauka, Technologia, Jakość, 3 (44).
- [9] Kilarski W. (2007), *Strukturalne podstawy biologii komórki*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [10] Markiewicz Z. (1993), *Struktura i funkcje osłon bakteryjnych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [11] Vollmer W., Höltje J. V. (2004), *The architecture of the murein (peptidoglycan) in Gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)*, Journal of Bacteriology, 186, 5978-5987.
- [12] Doyle R. J., Matthews T. H., Streips U. N. (1980), *Chemical basis for selectivity of metal ions by the Bacillus subtilis cell wall*, Journal of Bacteriology, 143, 471-480.
- [13] Koebnik R., Locher K. P., van Gelder P. (2000), *Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels and nutshell*, Molecular Microbiology, 37, 239-253.
- [14] Hammond S. M., Lambert P. A., Rycroft A. N. (1984), *The bacterial cell surface*, Croom Helmm, London, 226.
- [15] Knirel, Yuriy A., Valvano, Miguel A. (Eds.) Book (2011), *Bacterial Lipopolysaccharides Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells*. Holst O.: *Structure of the Lipopolysaccharide Core Region*, 21-39.
- [16] Schär-Zammaretti P., Ubbink J. (2003), *The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations*, Biophysical Journal, 85, 4076-4092.
- [17] Beveridge T. J., Davies J. A. (1983), *Cellular responses of Bacillus subtilis and Escherichia coli to the Gram stain*, Journal of Bacteriology, 846-858.
- [18] Tamm L. K., Hong H., Liang B. (2004), *Folding and assembly of  $\beta$ -barrel membrane proteins*, Biochimica Biophysica Acta, 1666, 250-263.
- [19] Voulhoux R., Bos M. P., Geurtsen J., Mols M., Tommassen J. (2003), *Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly*, Science, 299, 262-265.
- [20] Nikaido H. (2003), *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67, 593-656.

- [21] Nikaido H., Rosenberg Y. E., Foulds J. (1983), *Porin channels in Escherichia coli: studies with beta-lactams in intact cells*, Journal of Bacteriology, 153, 232-240.
- [22] Schulz G. E. (2002), *The structure of bacterial outer membrane proteins*. Biochimica et Biophysica Acta, 1565, 308-317.
- [23] Wexler H. M. (2002), *Outer-membrane pore-forming proteins in Gram-negative anaerobic bacteria*. Clinical Infectious Diseases, 35 (Suppl. 1), 65-71.
- [24] Aleksander C., Rietschel E. T. (2001), *Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity*. Journal of Endotoxin Research, 7, 167-202.
- [25] Raetz Ch. R. H., Whitfield Ch. (2002), *Lipopolysaccharide endotoxins*, Annual Review of Biochemistry, 71, 635-700.
- [26] Holst O., Ulmer A. J., Brade H., Flad H. D., Rietschel E. Th. (1996), *Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins*, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 16, 83-104.
- [27] Kaszowska M. (2004), *Budowa chemiczna i biosynteza lipo polisacharydu – ważnego składnika osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 58, 333-342.
- [28] Anderson M. S., Bull H. G., Galloway S. M., Kelly T. M., Mohan S., Radica K., Raetz Ch. R. H. (1993), *UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase of Escherichia coli. The first step of endotoxin biosynthesis is thermodynamically unfavorable*. Journal of Biological Chemistry, 268, 19858-19865.
- [29] Knirel, Yuriy A., Valvano, Miguel A. (Eds.) Book (2011), *Bacterial Lipopolysaccharides Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells*. Silipo A., Molinaro A.: *Lipid A Structure*, 1-20.
- [30] Knirel, Yuriy A., Valvano, Miguel A. (Eds.) Book (2011), *Bacterial Lipopolysaccharides Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells*. Kusumoto S.: *Chemical Synthesis of Lipid A and Analogues*, 117-130.
- [31] Caroff M., Karibian D. (2003), *Structure of bacterial lipopolysaccharides*, Carbohydrate research, 338, 2431-2447.
- [32] Rietschel E. Th., Kirikae T., Schade F. U., Ulmer A. J., Holst O., Brade H., Schmidt G., Mamat U., Gimmecke H. D., Kusumoto S., Zähringer U. (1993), *The chemical structure of bacterial endotoxin in relations to bioactivity*, Immunobiology, 187, 169-190.
- [33] Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I. R. (2002), *Structure and function of lipopolysaccharides*, Microbes and Infections, 4, 837-851.
- [34] Kulshin V. A., Zähringer U., Lindner B., Jäger K. E., Dmitriev B. A., Rietschel E. T. (1991), *Structural characterization of the lipid A component of Pseudomonas aeruginosa wild-type and rough mutant lipopolysaccharides*. European Journal of Biochemistry, 198, 697-704.
- [35] Różalski A. (1995), *Lipopolisacharyd (LPS) bakterii Gram-ujemnych – struktura chemiczna, aktywność biologiczna i znaczenie w chorobotwórczości – cz. I, II, III*. Postępy Mikrobiologii, 35, 289-337.
- [36] Tanamoto K. (1994), *Free hydroxyl groups are not required for endotoxic activity of lipid A*. Infection and Immunity, 62, 1705-1709.
- [37] Schromm A. B., Brandenburg K., Loppnow H., Moran A. P., Koch M. H., Rietschel E. T., Seydel U. (2000), *Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion*. European Journal of Biochemistry, 267, 2008-2013.

- [38] Holst O. (2007), *The structure of core regions from enterobacterial lipopolysaccharides-an update*. FEMS Microbiology Letters, 271, 3-11.
- [39] Jansson P. E. (1999), *The chemistry of O-polysaccharide chains in bacterial lipopolysaccharides*. Endotoxin in Health and Disease, red.: Brade H., Opal S. M., Vogel S. N., Morrison D. C. M. Dekker New York, USA; 55-178.
- [40] Lodowska J., Zięba A., Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z. (2006), *Metody derywatywacji komponentów lipopolisacharydów w ocenie ich struktury chemicznej technikami chromatograficznymi*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 60, 113-128.
- [41] Sutherland I. W. (1999), *Polysaccharases for microbial exopolysaccharides*, Carbohydrate Polymers, 38, 319-328.
- [42] Beveridge T. J. (1999), *Structures of Gram-negative cell walls and their deriv membrane vesicles*. Journal of Bacteriology, 181, 4725-4733.
- [43] Wexler H. M. (2002), *Outer-membrane pore-forming proteins in Gram-negative anaerobic bacteria*. Clinical Infectious Diseases, 35 (Suppl. 1), 65-71.
- [44] Dutkiewicz J., Górny R. L. (2002), *Biologiczne czynniki szkodliwe dla zdrowia, klasyfikacja i kryteria oceny narażenia*, Medycyna Pracy, 53; 1; 29—39.
- [45] Douwes J., Thorne P., Pearce N., Heederik D. (2003), *Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects*, Annals of Occupational Hygiene, 47/3: 187-200.
- [46] Baron P. A., Willeke K. (Ed.) (2001), *Aerosol measurement: principles, techniques and applications*, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- [47] Pastuszka J. S., Lis D., Wlazło A. (1998), *Bioaerozole bakteryjne i grzybowe w środowisku mieszkalnym w górnym okręgu przemysłowym*, Medycyna Środowiskowa, 1/1: 45-51.
- [48] Lis D., Pastuszka J., S., Górny R. (1997), *Występowanie aerozolu bakteryjnego i grzybowego w mieszkaniach, biurach i środowisku zewnętrznym Górnego Śląska*, Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 1, 59-68.
- [49] Przestalski S. (2001), *Elementy fizyki, biofizyki i agrofizyki*, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław.
- [50] Genet M. J., Dupont-Gillain C. C., Rouxhet P. G. (2008), *XPS Analysis of Biosystems and Biomaterials*, Medical Applications of Colloids (ed. E. Matijevic), Springer, New-York, 177-307.
- [51] Briggs D., Grant J., T. (Eds) (2003), *Surface Analysis by Auger and X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, IM Publications, Chichester.
- [52] Pietrzyk M. A., Orłowski B. A., Kowalski B. J., Dziawa P., Osinniv V., Taliashvili B., Johnson R. L. (2006), *Fotoemisyjne badania gadolinu osadzonego na czystej powierzchni PbGdTe*, Synchrotron Radiation in Natural Science 5, 3, Warszawa.
- [53] Kolenda M. (1999), (red.) Hryniewicz A. Z., Rokita E., *Spektroskopia fotoelektronów; Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska*, rozdział 8, 222 – 238, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [54] Oleś A. (1998), *Metody doświadczalne fizyki ciała stałego*, wyd. 2 zm.; Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa.

- [55] Zieliński W. (red.), Rajca A. (red.) (2000), *Metody spektroskopowe i ich zastosowania do identyfikacji związków organicznych*; wyd. 2 rozszerzone i uaktualnione, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa.
- [56] Magiera A. (red.) (aut. rozdz. A. Budkowski), (2006), *I Pracownia fizyczna*, Instytut Fizyki. Uniwersytet Jagielloński w Krakowie: "Impuls".
- [57] Tanger D. W. (1973), *Photoelectron Spectroscopy of Solids*, Festkörperprobleme XII.
- [58] Hüfner S. (1996), *Photoelectron Spectroscopy – Principles and Applications*, Springer – Verlag, Berlin.
- [59] Sherwood P. M. A. (1996), *Curve fitting in surface analysis and the effect of background inclusion in the fitting process*, Journal of Science & Technology Vacuum/tom 14, 1424.
- [60] Moulder J. F., Stickle W. F., Sobol P. E., Bomben K. D. (1995), *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy. A Reference Book of Standard Spectra for Identification and Interpretation of XPS Data*; Physical Electronics Inc., Eden Prairie, Minnesota.
- [61] Briggs D. (2005), *Surface Analysis of Polymers by XPS and Static SIMS (Cambridge Solid State Science Series)*, Published by Cambridge Univ Pr, United Kingdom.
- [62] Kęcki Z. (1992), *Podstawy spektroskopii molekularnej*, wyd. 3 zmienione i rozszerzone, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [63] Szajek A., Kuźmiński S. (2000), *Podstawy fizyki powierzchni półprzewodników*, WNT Warszawa.
- [64] Bielski J. (2008), Praca dyplomowa, *Zastosowanie metody XPS do analizy cienkich warstw tlenku ceru domieszkowanego tlenkiem gadolinu otrzymanych metoda ablacji laserowej*. Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie.
- [65] Budkowski A., Gondek Ł. (2003), *Spektroskopia fotoelektronów (XPS) cienkich warstw polimerów*, Zakład Inżynierii Nowych Materiałów, Uniwersytet Jagielloński.
- [66] Szczepanik W. (2004), *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [67] Strona internetowa Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego: <http://www.zfk.us.edu.pl/>.
- [68] Stachura Z., (red.) Hryniewicz A. Z., Rokita R. (2013), *Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska. Mikroskopia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [69] Barbacki A., Czajka R., Jóźwiak K., Kachlicki T. (2005), *Mikroskopia elektronowa*, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej, Poznań.
- [70] Sokołowski J., Pluta B., Nosiła B. (1980), *Elektronowy mikroskop skaningowy. Zasada działania i zastosowanie*. Gliwice.
- [71] Materiały informacyjne firmy JEOL. *Scanning Electron Microscope A to Z. Basic knowledge for using the SEM*.
- [72] Goldstein J., Newbury D. E., Joy D. C., Lyman C. E., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L., Michael J. R. (2003) Third Edition, *Scanning electron microscopy and microanalysis*, Plenum Press, New York & London.
- [73] „Podstawy mikroskopii skaningowej”.– opracowanie udostępnione przez mgr Ewę Teper z Wydziału Nauk o Ziemi: <http://ultra.cto.us.edu.pl/~kgmip/PODSTAWY%20MIKROSKOPII%20SKANINGOWEJ.doc>
- [74] Autrata R. (1984), *A double detector system for BSE and SE imaging*, Scanning 6, 174-182.

- [75] Krzysztof M. (2010), *Detekcja sygnału i technika obrazowania w skaningowym mikroskopie elektronowym w zakresie niskiej próżni*, Rozprawa Doktorska, Politechnika Wrocławska, Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki, Wrocław.
- [76] Reimer, L. (1998), *Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis*. Springer, Berlin 527.
- [77] Radzinski Z. J. (1987), *Scanning electron microscope solid state detectors*, Scanning Microscopy 1, 975-982.
- [78] Rösler M., Brauer W. (1981), *Theory of secondary electron emission*, Physica Status Solidi (B) 104, 161.
- [79] Goldstein J., Newbury D., Joy D., Lyman Ch., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L., Michael J. (2003), *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis* (Third Edition). Kluwer Academics/Plenum Publishers.
- [80] Goodhew P., Humphries J., Beanland R. (2001), *Electron Microscopy and Analysis*, (Third Edition), Taylor & Francis, London.
- [81] Paluszyński J. (2006), *Ilościowa rekonstrukcja topografii powierzchni drogą cyfrowego przetwarzania sygnałów w skaningowej mikroskopii elektronowej*, Rozprawa Doktorska, Politechnika Wrocławska, Wydział Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki, Wrocław.
- [82] Kaczmarek D. (1999), *Rekonstrukcja obrazu powierzchni próbki w elektronowym mikroskopie skaningowym za pomocą elektronów wstecznie rozproszonych*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
- [83] Griffin B. J. (2008), *Variable Pressure and Environmental Scanning Electron Microscopy – Imaging of Biological Samples*, Methods in Molecular Biology. vol. 369, pp. 467-495.
- [84] Greiser J. (2009), Advances in Cryo-SEM: From Micrometers to Nanometers. *American Laboratory* 41(12): 11-13.
- [85] Donald A. M., Baker F. S., Smith A. C., Waldron K. W. (2003), *Fracture of plant tissues and walls as visualized by Environmental Scanning Electron Microscopy*, Annals of Botany 92, 73-77.
- [86] Phillips M. R., Toth M., Drouin D. (1999), *A novel technique for probe intensity characterization in the environmental scanning electron microscope*, Microscopy and Microanalysis, 5(2), 294-295.
- [87] Erlandsen S., Lei M., Martin-Lacave I., Dunny G., Wells C. (2003). *High resolution Cryo FESEM of microbial surfaces*. Microscopy and Microanalysis 9:273-278.
- [88] Bergmans L., Moisiadis P., Van Meerbeek B., Quirynen M., Lambrechts P. (2005). *Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM*. International Endodontic Journal 38, 775-788.
- [89] Zhu Y. J., Olson N., Beebe T. P. (2001), *Surface chemical characterization of 2.5 particulates (PM2.5) from air pollution in Salt Lake City using TOF-SIMS, XPS, and FTIR*. Environmental Science & Technology 35, 3113-3121.
- [90] Dufrêne, Y. F., Boonaert, C. J. P., Rouxhet, P. G. (1999), *Surface analysis by X-ray photoelectron spectroscopy in study of bioadhesion and biofilms*. Methods in Enzymology, 310, 375-389.
- [91] van der Mei H. C., de Vries J., Busscher H. J. (2000), *X-ray photoelectron spectroscopy for the study of microbial cell surfaces*. Surface Science Reports 39, 1-29.

- [92] Dufrene Y. F., van der Wal A., Norde W., Rouxhet P. G. (1997), *X-ray photoelectron spectroscopy analysis of whole cells and isolated cell walls of Gram-positive bacteria: comparison with biochemical analysis*. Journal of Bacteriology 179, 1023-1028.
- [93] Pembrey R. S., Marshall K. C., Schneider R. P. (1999), *Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties?* Applied and Environmental Microbiology 65, 2877-2894.
- [94] Marshall K. C., Pembrey R., Schneider R. P. (1994), *The relevance of X-ray photoelectron spectroscopy for analysis of microbial cell surfaces: a critical view*. Colloid Surfaces B: Biointerfaces 2, 371-376.
- [95] Mozes N., Lortal S. (1995), *X-ray photoelectron spectroscopy and biochemical analysis of the surface of Lactobacillus helveticus ATCC 1246*. Microbiology 141, 11-19.
- [96] Słoka J., Pastuszka J. S., Talik E., Wlazło A. (2002), *Study of the cell surface of the collected airborne bacteria by X-ray photoelectron spectroscopy. Preliminary results*. Proceedings of the NOSA Aerosol Symposium. Kjeller, Norway, 65-66.
- [97] Słoka J., Pastuszka J. S., Talik E., Hacura A., Słoka J., Wlazło A. (2005), *Chemical characterization of airborne bacteria using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIRS)*. Aerobiologia 21, 181-192.
- [98] Kolenda M., (red.) Hryniewicz A. Z., Rokita R. (2013), *Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska. Spektroskopia fotoelektronów*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [99] Rouxhet P. G., Mozes N., Dengis P. B., Dufrene Y. F., Gerin P. A., Genet M. J. (1994), *Application of X-ray photoelectron spectroscopy to microorganisms*. Colloids Surfaces B Biointerfaces 2, 347-369.
- [100] Wlazło A., Pastuszka J. S., Łudzeń-Izbińska B. (2002), *Ocena narzażenia na aerozol bakteryjny pracowników niedużej oczyszczalni ścieków*. Medycyna Pracy 53, 109-114.
- [101] Jurkiewicz G., Markiewicz P., Skorupski W. (1998), *Zorganizowane składowisko odpadów komunalnych jako źródło zanieczyszczeń powietrza*. Chemia i Inżynieria Ekologiczna. Opole, 5, 583-593.
- [102] van der Mei H. C., Léonard A. J., Weerkamp A. H., Rouxhet P. G., Busscher H. J. (1988), *Surface properties of Streptococcus salivarius HB and nonfibrillar mutants: measurement of zeta potential and elemental composition with X-ray photoelectron spectroscopy*. Journal of Bacteriology 170(6), 2462-2466.
- [103] Rouxhet, P. G., Genet M. J. (1991), *Chemical composition of the microbial cell surface by X-ray photoelectron spectroscopy*, (eds. N. Mozes, P. S. Handley, H. J. Busscher, P. G. Rouxhet), In *Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical methods*. VCH Publishers, New York, 173-220.
- [104] Gerin, P. A., Dengis P. B., Rouxhet P. G. (1995), *Performance of XPS analysis of model biochemical compounds*. Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique 92, 1043-1065.
- [105] Boonaert Ch. J. P., Rouxhet P. G. (2000), *Surface of lactic acid bacteria: relationships between chemical composition and physicochemical properties*. Applied and Environmental Microbiology 66, 2548-2554.
- [106] Pradier C. M., Rubio C., Poleunis C., Bertrand P., Marcus P., Compe`re C. (2005), *Surface characterization of three marine bacterial strains by Fourier transform IR, X-ray photoelectron spectroscopy, and time-of-flight secondary-ion mass spectrometry, correlation with adhesion on stainless steel surfaces*. Journal of Physical Chemistry B. 19; 109(19): 9540-9549.

- [107] Buszewski B., Dziubakiewicz E., Pomastowski P., Hryniewicz K., Płoszaj-Pyrek J., Talik E., Kramer M., Albert K. (2015) *Assignment of functional groups in Gram-positive bacteria*. Analytical Method Development and Validation: A Concise Review. Journal of Analytical Bioanalytical Techniques 6: 232.
- [108] Kiely J. L., Olson N. F. (2000), *The physicochemical surface characteristics of Lactobacillus casei*. Food Microbiology 17, 277-291.
- [109] Carlson C. R., Johansen T., Kolsto A. B. (1996), *The chromosome map of Bacillus thuringiensis subsp. canadensis HD224 is highly similar to that of the Bacillus cereus type strain ATCC14579*. FEMS Microbiology Letters 141, 163-167.
- [110] Leone L., Loring J., Sjöberg S., Persson P., Shchukarev A. (2006), *Surface characterization of the Gram-positive bacteria Bacillus subtilis—an XPS study*. Surface and Interface Analysis 38, 202–205.
- [111] Rouxhet, P. G., Genet M. J. (2011), *XPS analysis of bio-organic systems*. Surface and Interface Analysis 43, 1453–1470.
- [112] Delcour, J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E., Hols P. (1999), *The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek. 76, 159–184.
- [113] Busscher, H. J., Bos R., van der Mei H. C., Handley P. S. (2000), *Physicochemistry of microbial adhesion from an overall approach to the limits*. In Physical Chemistry of Biological Interfaces. A. Baszkin, W. Norde, ed. Marcel Dekker, New York. 13, 431–458.
- [114] Schär-Zammaretti P., Ubbink J. (2003), *The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations*. Biophysical Journal 85, 4076-92.
- [115] Amory D. E., Mozes N., Hermesse M. P., Leonard A. J., Rouxhet P. G. (1988), *Chemical analysis of the surface of microorganisms by X-ray photoelectron spectroscopy*. FEMS Microbiology Letters 49, 107–110.
- [116] Beamson, G., Briggs, D. (1992), *High Resolution XPS of Organic Polymers. The Scienta ESCA300 Database*; John Wiley and Sons: New York.
- [117] Dufrene Y. F., Rouxhet P. G. (1996), *Surface composition, surface properties and adhesiveness of Azospirillum brasilense – variation during growth*. Canadian Journal of Microbiology 42, 548–556.
- [118] Płoszaj-Pyrek J., Talik E., Piotrowska-Seget Z. (2012), *Badanie aerozoli bakteryjnych z oczyszczalni ścieków za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego z przystawką Cryo i spektroskopu fotoelektronów XPS*. Artykuł w monografii: Pierwsze Śląskie Seminarium Aerozolowe, s. 43-47.
- [119] Ramstedt M., Leone L., Persson P., Shchukarev A. (2014), *Cell Wall Composition of Bacillus subtilis Changes as a Function of pH and Zn<sup>2+</sup> Exposure: Insights from Cryo-XPS Measurements*. Langmuir 30 (15), 4367–4374.
- [120] Omoike A., Chorover J. (2004), *Spectroscopic study of extracellular polymeric substances from Bacillus subtilis: aqueous chemistry and adsorption effects*. Biomacromolecules 5, 1219-1230.
- [121] Hamadi F., Latrache H., Zahir H., Elghmari A., Timinouni M., Ellouali M. (2008), *The relation between Escherichia coli surface functional groups' composition and their physicochemical properties*. Brazilian Journal of Microbiology 39, 10-15.
- [122] Ramstedt M., Nakao R., Wai S. N., Uhlin B. E., Boily J. F. (2011), *Monitoring surface chemical changes in the bacterial cell wall: multivariate analysis of cryo-x-ray photoelectron spectroscopy data*. Journal of Biological Chemistry. 8; 286(14): 12389-96.

- [123] Ahimou F., Boonaert C. J., Adriaensen Y., Jacques P., Thonart P., Paquot M., Rouxhet P. G. (2007), *XPS analysis of chemical functions at the surface of Bacillus subtilis*. Journal of Colloid and Interface Science 1; 309(1), 49-55.
- [124] Kern T., Giffard M., Hediger S., Amoroso A., Giustini C., Bui N. K., Joris B., Bougault C., Vollmer W., Simorre J. P. (2010), *Dynamics Characterization of Fully Hydrated Bacterial Cell Walls by Solid-State NMR: Evidence for Cooperative Binding of Metal Ions*, Journal of the American Chemical Society, 132, 10911-10919.
- [125] Mozes N., Léonard A., Rouxhet P.G. (1988), *On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 94, 324-334.
- [126] Płoszaj-Pyrek J., Talik E., Piotrowska-Seget Z. (2014), *Studies of the bacterial surfaces by XPS and SEM methods*. Acta Physica Polonica, Vol.125 – Nr 4(I) 929-931.
- [127] Khaleghi M., Kermanshahi R. K. (2012), *Effect of environmental stresses on s-layer production in Lactobacillus acidophilus ATCC 4356*. Advances in Applied Microbiology, 820–825.
- [128] Kaca W., Amano K. (2000), *Interaction and division of bacterial cells*. Postępy Mikrobiologii, 40, 31-41.
- [129] Baatout S., Leys N., Hendrickx L., Dams A., Mergeay M. (1996), *Physiological changes induced in bacteria following pH stress as a model for space research*. Acta Astronautica 60, Issues 4–7, 451–459.
- [130] Müller G. (1983), *Podstawy mikrobiologii żywności*. Wyd. Naukowo - Techniczne, Warszawa, 60-78.
- [131] Bozzola J. J., Russell L. D. (1999), *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- [132] McIntosh, J. R. (ed.). (2007), *Cellular electron microscopy*. Methods in Cell Biology 79. Elsevier, San Diego, CA.
- [133] Zuzarte M., Dinis A. M., Cavaleiro C., Canhoto J., Salgueiro L. (2008), *Trichomes morphology and essential oils characterization of field-growing and in vitro propagated plants of Lavandula pedunculata*. Microscopy and Microanalysis 14(3): 148-149.
- [134] Endoh K., Kasuga J., Keita A., Toshiaki I., Fujikawa S. (2009), *Cryo-scanning electron microscope study on freezing behaviors of tissue cells in dormant buds of larch (Larix kaempferi)*. Cryobiology 59, 214-222.
- [135] Bray D. (2000), *Critical point drying of Biological Specimens for Scanning Electron Microscope*. Methods in Biotechnology 13, 235-243.
- [136] Roy S., Babic I., Watada A. E., Wergin W. P. (1996), *Unique advantages of using low temperature scanning electron microscopy to observe bacteria*. Protoplasma 195, Issue 1-4, 133-143.
- [137] Dohnalkova A. C., Marshall M. J., Arey B. W., Williams K. H., Buck E. C., Fredrickson J. K. (2011), *Imaging Hydrated Microbial Extracellular Polymers: Comparative Analysis by Electron Microscopy*. Applied and Environmental Microbiology vol. 77(4), 1254-1262.
- [138] Alhede M., Qvortrup K., Liebrechts R., Høiby N., Givskov M., Bjarnsholt T. (2012), *Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 65(2), 335-42.



- [139] Villena G. K., Fujikawa T., Tsuyumu S., Gutiérrez-Correa M. (2010), *Structural analysis of biofilms and pellets of Aspergillus niger by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy*. Bioresource Technology 101(6), 1920-6.
- [140] Tielen E., Rosenau F., Wilhelm S., Jaeger K. E., Flemming H.C., Wingender J. (2010), *Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 156(Pt 7), 2239-52.
- [141] Tenke P., Kovacs B., Jäckel M., Nagy E. (2006), *The role of biofilm infection in urology*. World Journal of Urology 24(1), 13-20.
- [142] Lindsay D., Brözel V. S., Mostert J. F., von Holy A. (2000), *Physiology of dairy-associated Bacillus spp. over a wide pH range*. International Journal of Food Microbiology 10; 54(1-2), 49-62.